



**Universidad de Guayaquil
Facultad de Ciencias para el Desarrollo**

Carrera de Ingeniería Agronómica

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
Presentado previo a la obtención del título de**

INGENIERO AGRÓNOMO

Tema:

Establecimiento de un banco de germoplasma de clones élite de banano (*Musa* spp.) cv. Williams, Valery (AAA) y plátano Barraganete (AAB) en condiciones de crioconservación

Autor:

Guillermo Antonio Reyes Román

Tutor:

Blgo. José Alcides Flores Cedeño M.Sc

Cotutor:

Ing. Amalia Marisol Vera Oyague M.Sc

Guayaquil, Ecuador

2016

Universidad de Guayaquil
Facultad de Ciencias para el Desarrollo

Carrera de Ingeniería Agronómica

Proyecto de investigación presentado previo a la obtención del título de

INGENIERO AGRÓNOMO

Tema:

Establecimiento de un banco de germoplasma de clones élite de banano (*Musa* spp.)
cv. Williams, Valery (AAA) y plátano Barraganete (AAB) en condiciones de
crioconservación

Autor:

Guillermo Antonio Reyes Román

Tutor:

Blgo. José Alcides Flores Cedeño M.Sc

Cotutor:

Ing. Amalia Marisol Vera Oyague M.Sc

Tribunal de Sustentación

Ing. Milton Barcos Arias Ph.D
Presidente

Ing. Francisco Muñoz Montecé M.Sc
Vocal

Ing. Albino Fernández Mendoza M.Sc
Vocal

Dedicatoria

«Mi dedicatoria está dirigida con todo mi afecto a todas aquellas personas ejemplares que de una manera u otra apoyaron de manera desinteresada y bondadosa a esta causa, y aunque no sean mencionadas por ser incalculable su cantidad, tengan presente que su apoyo cumplió un propósito».

Agradecimientos

A ti Dios por abrirme una vía hacia el conocimiento, y aunque un gracias no basta para demostrar mi gratitud, prometo seguir el camino que decidas ponerme en frente.

A mi familia, por su inmensa motivación y apoyo incondicional.

A la Ph.D Daynet Sosa, directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, por su aprobación y apoyo para realizar mí trabajo de titulación.

Al M.Sc José Flores, director de tesis, por haber brindado su experiencia e ideas para llevar a cabo mi trabajo.

A Joffre Mendoza y Fernando Piña, quienes brindaron su ayuda durante el transcurso y la conclusión del trabajo experimental.

Al Ph.D Omar Ruiz, Ing. José García e Ing. Karla Aguaguña por su gentil ayuda en el diseño experimental y análisis estadístico que contribuyó a fortalecer la investigación.

A mis maestros de la Facultad de Ciencias para el Desarrollo, y a mis amigos que también brindaron su colaboración.

DECLARACIÓN EXPRESA

«La responsabilidad del contenido de este trabajo de investigación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador CIBE-ESPOL»

Guillermo A Reyes Román

Índice

| | |
|---|-----|
| Lista de Figuras..... | I |
| Lista de Tablas..... | III |
| Abreviaturas..... | IV |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Situación problemática | 3 |
| 1.1.1 Descripción del problema..... | 3 |
| 1.1.2 Problema..... | 4 |
| 1.2 Preguntas de investigación | 4 |
| 1.3 Delimitación del problema | 4 |
| 1.3.1 Temporal..... | 4 |
| 1.3.2 Espacial..... | 4 |
| 1.4 Objetivo general | 4 |
| 1.5 Objetivos específicos..... | 5 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 2.1 Origen de las musáceas..... | 6 |
| 2.2 Posición taxonómica..... | 7 |
| 2.3 Clasificación moderna | 7 |
| 2.3.1 Cultivares de banano ‘Subgrupo Cavendish’ | 8 |
| 2.3.2 Cultivares de plátano ‘Subgrupo Plantain’ | 9 |
| 2.4 Importancia y producción de los bananos y plátanos | 10 |
| 2.5 Conservación del germoplasma vegetal | 12 |
| 2.6 El cultivo de tejidos en la conservación del germoplasma..... | 12 |
| 2.7 Tipos de conservación in vitro..... | 13 |
| 2.7.1 Conservación in vitro a corto plazo..... | 14 |
| 2.7.2 Crioconservación..... | 14 |
| 2.7.3 Consideraciones para la crioconservación del germoplasma..... | 16 |
| 2.7.4 Métodos de vitrificación..... | 18 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 21 |
| 3.1 Ubicación del área de estudio..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 3.2 Material vegetal | 21 |
| 3.3 Etapa de introducción | 21 |
| 3.4 Etapa de establecimiento in vitro..... | 21 |
| 3.5 Etapa de multiplicación in vitro..... | 22 |
| 3.6 Etapa de enraizamiento..... | 22 |
| 3.7 Etapa de crioconservación | 24 |
| 3.7.1 Extracción de los micromeristemas..... | 24 |
| 3.7.2 Pre-tratamiento..... | 24 |
| 3.7.3 Inmersión en nitrógeno líquido..... | 25 |
| 3.7.4 Post-tratamiento..... | 25 |
| 3.8 Variables evaluadas en la recuperación y regeneración | 27 |
| 3.9 Diseño experimental | 27 |
| 3.10 Evaluación estadística..... | 29 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 30 |
| 4.1 Establecimiento in vitro de los cultivares..... | 30 |
| 4.1.1 Fenolización de los cultivos..... | 30 |
| 4.2 Multiplicación in vitro | 32 |
| 4.3 Enraizamiento in vitro | 33 |
| 4.4 Crioconservación..... | 33 |
| 4.4.1 Pre-tratamiento..... | 33 |
| 4.4.2 Post-tratamiento..... | 34 |
| 4.4.3 Recuperación..... | 34 |
| V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 43 |
| 5.1 Conclusiones..... | 43 |
| 5.2 Recomendaciones | 43 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Etapas del cultivo in vitro de plátano ‘Barraganete’: a. introducción; b. establecimiento in vitro; c. propagación; d. enraizamiento. | 22 |
| Figura 2. Etapas del cultivo in vitro de banano ‘Williams’: a. introducción; b. establecimiento in vitro; c. propagación; d. enraizamiento. | 23 |
| Figura 3. Etapas del cultivo in vitro de banano ‘Valery’: a. introducción; b. establecimiento in vitro; c. propagación; d. enraizamiento. | 23 |
| Figura 4. Explantes en etapa de establecimiento in vitro | 31 |
| Figura 5. Coeficiente de multiplicación de los cultivares. | 32 |
| Figura 6. Porcentaje de fenolización de los cultivares. | 35 |
| Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia de los cultivares. | 36 |
| Figura 8. Comparación estadística de la sobrevivencia de los micromeristemas de cada cultivar, luego de la crioconservación. | 37 |
| Figura 9. Brotes recuperados de los cultivares cuatro semanas después de la descongelación..... | 38 |
| Figura 10. Porcentaje de regeneración de los cultivares. | 39 |
| Figura 11. Comparación estadística de la sobrevivencia de los micromeristemas de cada cultivar luego de la crioconservación. | 40 |
| Figura 12. Comparación estadística de la sobrevivencia y regeneración de los micromeristemas de cada cultivar, de acuerdo a la metodología utilizada. | 40 |
| Figura 13. Desarrollo de brotes a partir de micromeristemas descongelados. | 41 |
| Figura 14. Plantas madres a. ‘Williams’, b. ‘Valery’, c. ‘Barraganete’. | 54 |
| Figura 15. Etapa de cultivo in vitro; a. introducción, b. desinfección, c. disección, d. establecimiento in vitro. | 54 |
| Figura 16. Etapa de multiplicación de ‘Williams’; a. pase 1, b. pase 2, c. pase 3, d. enraizamiento. | 55 |
| Figura 17. Etapa de multiplicación de ‘Valery’; a. pase 1, b. pase 2, c. pase 3, d. enraizamiento..... | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Etapa de multiplicación de ‘Barraganete’; a. pase 1, b. pase 2, c. pase 3, d. pase 4..... | 56 |
| Figura 19. Etapa de crioconservación; a. extracción de los micromeristemas, b. tratamiento con criopreservantes, c. goteo de la PVS2 en láminas de aluminio, d. inmersión en N ₂ L..... | 56 |
| Figura 20. Reacción de los micromeristemas después de la crioconservación..... | 57 |
| Figura 21. Supervivencia de los micromeristemas..... | 57 |
| Figura 22. Regeneración de los micromeristemas..... | 57 |
| Figura 23. Crecimiento de brotes regenerados. | 58 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Composición de las soluciones crioprotectoras..... | 25 |
| Tabla 2. Composición de los medios de cultivo de recuperación. | 26 |
| Tabla 3. Composición de los medios de cultivo de regeneración. | 27 |
| Tabla 4. Material experimental con tratamientos y repeticiones..... | 29 |
| Tabla 5. Porcentaje de contaminación de los cultivares..... | 30 |
| Tabla 6. Grados de oxidación y porcentaje de muerte de meristemas. | 31 |
| Tabla 7. Resultado de la multiplicación in vitro de los cultivares..... | 32 |
| Tabla 8. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 (MS). | 59 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| AEBE | Asociación de exportadores de banano del Ecuador |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AIA | Ácido indoleacético |
| BAP | 6-Benzilaminopurina |
| CIBE | Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador |
| EG | Etilenglicol |
| ESPOL | Escuela Superior Politécnica del Litoral |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| KU Leuven | Universidad Católica de Lovaina, Bélgica |
| MM | Medio de multiplicación |
| MS | Sales Murashige y Skoog |
| N ₂ L | Nitrógeno líquido |
| PCM | Medio de Precultivo |
| PVS2 | Solución de vitrificación de plantas |
| LS1 | Solución de carga |
| RS | Solución de recuperación |
| SIT | Sistema de inmersión temporal |
| μE | Micro Einstein |
| μL | Micro litro |
| μM | Micro moles |

Resumen

La agricultura y la biotecnología moderna son cada día más dependientes de sí mismas, muchas de las técnicas relacionadas han abierto nuevos campos, tanto de producción, comercialización y en los últimos tiempos para la conservación. El almacenamiento del germoplasma es una alternativa para conservar la diversidad genética vegetal, coadyuvando a los programas de mejoramiento y mantenimiento de fuentes de propagación para especies de interés. Se introdujeron y establecieron los explantes a condiciones *in vitro*, y se subcultivaron mensualmente hasta obtener la cantidad de vitroplantas necesaria. Una vez obtenidas estas fueron subcultivadas para su enraizamiento y vigorización con el propósito de poder extraer los micromeristemas (0,8-1 mm). Posteriormente fueron tratados con soluciones deshidratadoras-crioprotectoras (LS1, PVS2), preparándolas para la inmersión en nitrógeno líquido (-196 °C) por 30 minutos. Luego del procedimiento los explantes fueron rápidamente descongelados, lavados y sembrados en medios de recuperación y regeneración. Las condiciones de medio de cultivo fueron modificadas de acuerdo a las metodologías mencionadas por Panis (I) y Korneva (II) (concentración de macro-micro elementos, vitaminas, fuentes de carbono). Para los efectos descritos se evaluaron parámetros de sobrevivencia y regeneración. El análisis de datos se dispuso mediante un diseño de bloques completamente al azar, el cual involucraba un arreglo factorial de AxB con tres niveles ('Williams', 'Valery' y 'Barraganete'). El análisis estadístico de los resultados demostró que los cultivares de banano presentaron el mejor coeficiente de multiplicación en comparación al cultivar de plátano 'Barraganete'. Con respecto a la crioconservación, los cultivares 'Williams' y 'Valery' presentaron el mejor comportamiento aplicando la metodología II, mientras que 'Barraganete' presentó el menor promedio de regeneración sin encontrar diferencias entre las metodologías utilizadas.

Palabras clave: *Musa* spp, bancos de germoplasma, propagación *in vitro*, crioconservación, vitrificación, micromeristemas.

Summary

Agriculture and modern biotechnology are increasingly dependent on their own day, many of the techniques have opened new services related to the production and marketing in recent times for the conservation fields. Germplasm storage is an alternative to conserve the genetic diversity of plants, which contributes to the sources of improvement and maintenance programs propagation of species of interest. Explants were introduced and under conditions established in vitro, and subcultured monthly until the required number of seedlings. Once obtained these were subcultured to rooting and invigorating in order to extract the micromeristemos power (0.8-1 mm). They were treated with solutions dehydration-cryoprotectants (LS1, PVS2), preparation for immersion in liquid nitrogen (-196 ° C) for 30 minute. After the procedure of the explants were rapidly thawed, washed and seeded in the recovery media and regeneration. The culture medium conditions are modified according to the methods mentioned by Panis (I) and Korneva (II) (concentration of elements, vitamins, carbon sources macro-micro). For purposes parameters described survival and regeneration were evaluated. For the purposes described parameters were evaluated survival and regeneration. Data analysis prepared by a design of a randomized complete block, which involved a factorial arrangement AxB three levels ('Williams', 'Valery' and 'Barraganete'). Statistical analysis of the results showed that banana cultivar had the best multiplication coefficient compared to the banana cultivar 'Barraganete'. Regarding cryopreservation, the cultivars 'Williams and Valery' presented the best performance using the methodology II, while 'Barraganete' had the lowest average regardless of the methodology.

Keywords: *Musa* spp, genebanks, in vitro propagation, cryopreservation, vitrification, micromeristemos.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de las musáceas, el banano y el plátano son grupos de cultivos de capital importancia, pues en el ámbito comercial, agronómico y nutricional representan una parte significativa en el desarrollo de las distintas comunidades de América Latina (Albarrán, et al., 2011). Estas especies son cultivadas en más de 150 países del trópico y subtropical cuya superficie sembrada sobrepasa las 10 millones de hectáreas para una producción estimada de 100 millones de toneladas, donde más del 10 % se exporta en todo el mundo (Singh, Uma, Selvarajan, & Karihaloo, 2011). En Ecuador, la producción de plátano es destinada primordialmente para el consumo interno, mientras que la del banano se destina para el consumo externo donde más del 12 % de la población se beneficia directa e indirectamente de cada uno de los eslabones de la cadena productiva.

Considerado como el segundo rubro de mayor venta en comparación con otras frutas contribuye aproximadamente con el 28 % de las exportaciones totales y genera más de 2000 millones de dólares de ingreso al año. Con respecto al mercado, el país ocupa un puesto meritorio dentro del comercio mundial de la fruta, donde más del 60 % de la producción tiene dos destinos principales; la Unión Europea y los Estados Unidos de América, sin dejar de lado que es prácticamente el único proveedor de Rusia y parte de Asia. Paralelo a esto, la demanda del mercado internacional es creciente al paso de los años exigiendo una producción de calidad y cantidad, obligando al sector bananero a implementar tecnologías cada vez más sofisticadas, reemplazando cultivares tradicionales por mejorados. Sin embargo, la producción de estos cultivos no está exenta de dificultades que ejercen las plagas, enfermedades, catástrofes naturales, vejez de los cultivos, que entre otras más, son las causas que originan una reducción de sus rendimientos. En respuesta a esta problemática, se hace necesaria una alternativa eficiente que brinde la posibilidad de crear programas de mitigación y mejoramiento que comprendan no solo la obtención “semillas” de calidad sino también en las cantidades necesarias.

La aplicación de la biotecnología orientada a las especies vegetales es considerada como una herramienta de gran potencial para el beneficio de la agricultura, ya que su desarrollo ha logrado avances formidables que van desde mejorarlas genéticamente hasta protegerlas de su extinción (Villalobos & Engelmann, 1995). Siendo su aporte más significativo el apoyo al perfeccionamiento de la conservación, logrando disponer los recursos fitogenéticos para una producción sustentable.

El desarrollo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales en los últimos 40 años ha logrado el almacenamiento y multiplicación de las colecciones de germoplasma de un sinnúmero de especies recalcitrantes o de propagación vegetativa obligada. Para el almacenamiento de *Musa*, existe la conservación *in vitro*, que consiste en modificar las condiciones del medio de cultivo; como la adición de retardantes de crecimiento, inhibidores osmóticos, deshidratadores de tejidos, bajas temperaturas y menores condiciones de luz, realizados con el fin de reducir las tasas de crecimiento y extender el intervalo de subcultivos; sin embargo, dicha técnica, es muy cuestionada por generar inestabilidad genética a largo plazo (Roca, Arias, & Chávez, 1991).

La crioconservación, técnica de almacenamiento donde el material vegetal es sometido a temperaturas ultra bajas proporcionadas por el nitrógeno líquido (-196 ° C), con la que se consigue la detención del crecimiento hasta llegar a un estado de “supresión animada”, donde la división celular y todos los procesos metabólicos cesan, conservando de esta manera la integridad del material sin generar inestabilidad genética durante periodos indeterminados. En los últimos años, ha pasado de ser compleja a ser simple y efectiva a mediano y largo plazo en comparación con las técnicas convencionales. (García, Fera, & Acosta, 2007).

La crioconservación de meristemos apicales de *Musa* es realizada generalmente incorporando el tejido a procesos criogénicos en condiciones de deshidratación y enfriamiento. Para el almacenamiento de los cultivares de banano y plátano se han diseñado diversas técnicas, tal es el caso de la gota-vitrificación, encapsulación-vitrificación y método de criolámina, todas ellas basadas en el método de vitrificación (Digilio, 2015).

Dentro de los factores que inciden en las técnicas, podemos mencionar los siguientes; el estado inicial de las plantas, el genotipo empleado, la concentración o tipo de sustancia empleada como crioprotector, variaciones térmicas durante el congelamiento, el descongelamiento y el cultivo del material crioconservado. Los cuales deben ser ajustados para establecer un protocolo exitoso (Golmirzaie & Panta, 2000).

Es importante mencionar que, la aplicación de esta técnica ha logrado hasta la fecha, el almacenamiento seguro en nitrógeno líquido de 1 100 accesiones (situación a finales del 2009) que pertenecen a diferentes grupos genómicos procedentes de la colección mundial de germoplasma de *Musa* (Panis, 2009). Con estos antecedentes, la crioconservación se perfila como una alternativa promisoriosa para el almacenamiento de los cultivares.

1.1 Situación problemática

1.1.1 Descripción del problema.

Las principales fuentes importantes de germoplasma vegetal se están perdiendo de forma acelerada, los bancos de semillas botánicas resultan de gran utilidad en especies que se propagan sexualmente y cuyas semillas se mantienen viables durante un prolongado periodo de almacenamiento, pero no aplican para conservar especies de plantas con semillas de corta supervivencia, ni pueden emplearse en el caso de trabajar con plantas autoincompatibles, o plantas de propagación vegetativa obligada (García, Feria, & Acosta, 2007). Los bancos en condiciones de campo tienen como limitante la necesidad de grandes extensiones de tierra, los costos por mantenimiento asociados a labores agrotécnicas son altos, se hace necesario controlar patógenos y además son vulnerables a las alteraciones climáticas (Robinson & Galán, 2011).

En vista de que la preservación de semillas resulta no aplicable y la conservación en campo es tediosa para los cultivares comestibles de banano (Pocasangre, 1992), se estableció el almacenamiento de germoplasma in vitro, sin embargo, el mantenimiento de los mismos es trabajo intensivo, en condiciones de crecimiento reducidas y existe el riesgo de perder adhesiones debido a la contaminación o error humano, e inclusive, el material está riesgosamente sujeto a variación somaclonal.

1.1.2 Problema

La falta de material vegetal con calidad genética y fitosanitaria ha reducido la productividad de las plantaciones bananeras en el país, además de no poseer una alternativa biotecnológica como la tienen algunos países de la región: creando protocolos eficientes de conservación y propagación de plantas, que brinden respuestas ante problemas climáticos y agrícolas.

Los bancos de germoplasma vienen a constituir una alternativa viable que nos permitirá conservar especies elites y a la vez multiplicar en el momento que se requiera para suplir las necesidades del sector agrícola del país.

1.2 Preguntas de investigación

¿Cuál será el índice de sobrevivencia y regeneración de los clones de cada cultivar después de la crioconservación?

¿Cuál será la tasa de multiplicación de los clones de cada cultivar?

¿Cuál de los protocolos aplicados para crioconservación es el adecuado para cada cultivar?

1.3 Delimitación del problema

1.3.1 Temporal.

El trabajo de investigación se realizó a partir de febrero del 2015 hasta enero del 2016.

1.3.2 Espacial.

El trabajo se desarrollará en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del “Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador”, ubicado en la Escuela Superior Politécnica del Litoral, km 30.5 de la vía perimetral de la Ciudad de Guayaquil.

1.4 Objetivo general

Establecer un banco de germoplasma crioconservado de clones elite de *Musa spp* de los cultivares de banano ‘Williams’, ‘Valery’ y plátano ‘Barraganete’.

1.5 Objetivos específicos

Determinar las condiciones de establecimiento, multiplicación y enraizamiento a nivel in vitro de los cultivares.

Establecer las mejores condiciones para la regeneración de los cultivares posterior a la inmersión en nitrógeno líquido.

Establecer la mejor metodología para la crioconservación de los cultivares.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origen de las musáceas

El origen de las musáceas data de las regiones del sureste de Asia en un territorio limitado por la India en el Oeste, hasta el Pacífico en el Este, en cuyos bosques primarios o naturales pueden aun encontrarse ejemplares ancestrales diploides, no comestibles y seminíferos. Al pasar los años un sinnúmero de subespecies diploides de *Musa acuminata* Colla se cruzaron de manera espontánea dando lugar a la producción de numerosos híbridos interespecíficos, algunos de estos poseían un genoma triploide, eran partenocárpicos y tenían esterilidad femenina (Perea & Angarita, 1984). Los habitantes descubrieron que tales plantas tenían frutos de buen sabor y podían ser propagados vegetativamente por vástagos, y en consecuencia seleccionaron cruces superiores comestibles de *M. acuminata*, que luego se subcultivaron y distribuyeron localmente como cultivos de sustento (Robinson & Galán, 2012).

Los diploides y triploides seleccionados de *M. acuminata* fueron llevados por los árabes a Asia meridional, donde crecía de forma silvestre otra especie, *Musa balbisiana*, con genoma diploide y seminífera, produciéndose entonces una hibridación interespecífica que dio lugar a cruces diploides y triploides de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana*. No se conoce con precisión los albores de la propagación del cultivo de su centro de origen a otros lugares, pero se presume que el establecimiento de estos clones híbridos en la periferia pudo haber ocurrido en tiempos arcaicos, aunque los primeros registros de su cultivo se dataron en la India y extremo oriente en el año 2500 antes del presente (Lacayo, 2000).

Botánicamente estas especies son descritas como plantas herbáceas de gran tamaño, con un pseudotallo compuesto de vainas foliares de hojas grandes oblongas alargadas y erguidas con filotaxia en espiral, su inflorescencia hermafrodita crece por el centro del pseudotallo hasta alcanzar el follaje y emerge, por lo que se la denomina inflorescencia terminal (Muñoz, 2014).

Los cultivares de importancia agronómica en la actualidad no producen semillas y sus frutos alargados ligeramente curvados de piel gruesa poseen semilla estéril, debido a esto, los cormos o vástagos se emplean como material de siembra o de propagación (Alvarez, 2013).

2.2 Posición taxonómica

El nombre de *Musa* deriva del apelativo árabe *mouz*, por lo que, se especula que los primeros habitantes de Arabia ya conocían los bananos como lo demuestra el hecho de que esta planta aparezca citada en el Corán como “Árbol del paraíso”. Taxonómicamente fueron clasificados por primera vez por el botánico Carlos Linneo en el año 1783, quien les otorgó el nombre de *Musa sapientium* a aquellos bananos de postre caracterizados por su sabor dulce en la madurez, además de ser consumidos en fresco, y el de *Musa paradisiaca* a la colección de plátanos con elevado contenido de almidón que son consumidos después de un proceso de cocción; sin embargo, hoy en día se sabe que estas dos especies aparentes no son en absoluto verdaderas especies sino que ambas hacen referencia a híbridos triploides interespecíficos del grupo AAB muy estrechamente relacionados entre sí. En consecuencia, la primera clasificación trata de nombres de uso general que ya no son utilizados para diferenciar los bananos de los plátanos (Robinson & Galán, 2012).

2.3 Clasificación moderna

El nuevo método de clasificación de los bananos y plátanos fue desarrollado por Simmonds & Shepherd, (1955) quienes describieron que la mayoría de los actuales bananos comestibles derivan originariamente de dos especies seminíferas silvestres, *M. acuminata* Colla (genoma A) y *M. balbisiana* Colla (genoma B). Pese a ello la clasificación que proponen se basa en primer lugar a la relativa contribución de *M. acuminata* y *M. balbisiana* al cultivar considerado y, en segundo lugar a la ploidía o número cromosómico del cultivar, cualquiera de estos casos es válido para cualquier supuesto práctico que se tenga. Explicado de otra manera, es aceptado que todos los cultivares de plátanos y bananos del mundo, deben ser nombrados con el género *Musa* seguido de un código que indique el grupo cromosómico y el nivel de ploidía, indicando a continuación el nombre del subgrupo (cuando este exista) y

finalizando con el nombre común del cultivar (con diferentes sinonimias de acuerdo a la región) (Constantine, 2004).

2.3.1 Cultivares de banano ‘Subgrupo Cavendish’.

Este subgrupo es catalogado de importancia en el comercio mundial, tanto para la exportación en las zonas de los trópicos como para el comercio local en los subtrópicos. Se caracterizan por tener frutos dulces cuando están maduros y se consumen en crudo, la pulpa es de color blanco crema y su cascara amarillo claro. El pseudotallo posee una variación en la altura que va desde los 1,8-2 m del ‘Pequeño Enano’ a los 4-5 m de ‘Lacatán’ con numerosos cultivares de altura intermedia, actualmente se conocen cuatro grupos (Swennen, 2000).

2.3.1.1 Tipo Dwarf Cavendish o Pequeño Enano.

El principal cultivar es ‘Dwarf Cavendish’ cuyas sinonimias son ‘Pequeño Enano’, ‘Plátano Canario’ y ‘Dwarf Chinese’, ‘Basrai’ en la India, y ‘Enano’ en Latinoamérica. Se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, siendo la variedad de menor altura cultivada comercialmente, destaca por su fácil adaptación y alto rendimiento. Sin embargo, debido a su susceptibilidad al desorden fisiológico conocido como ‘obstrucción floral’, ha sido progresivamente abandonado y sustituido por cultivares Cavendish de mayor altura.

2.3.1.2 Tipo Giant Cavendish o Cavendish Gigante.

Los principales cultivares ‘Mons Mari’, ‘Williams’, ‘Gran Enano’ en Latinoamérica. Estos cultivares no son excesivamente altos, pero se denominan Cavendish Gigante para distinguirlos de los tipos Cavendish Enano. ‘Gran Enano’ es el cultivar líder en la exportación mundial, pero solo puede ser cultivado en lugares libres de la presencia de la raza 4 del hongo *Fusarium*. A partir del 2005, ‘Williams’ ha comenzado a sustituir a ‘Gran Enano’ en muchas plantaciones de Latinoamérica destinadas a la exportación debido a las ventajas que presentan sus racimos para ser empacados (Robinson & Galán, 2012).

2.3.1.3 Tipo Robusta.

Los principales clones de ‘Robusta’ son ‘Tall Mons Mari’ en Australia, ‘Poyo’ en las Antillas, ‘Valery’ en Latinoamérica. Estos cultivares son de mayor altura que los del tipo Cavendish Gigante, ‘Valery’ fue durante mucho tiempo un cultivar importante en el comercio mundial de exportación, pero por su altura y susceptibilidad a la raza 4 del hongo *Fusarium* está siendo sustituido por ‘Williams’ en muchas zonas exportadoras de Latinoamérica; sin embargo, ‘Valery’ posee mayor adaptación a climas húmedos y tolerancia a enfermedades, pudiendo ser utilizado en mejoras genéticas.

2.3.1.4 Tipo Lacatán.

Las principales sinonimias son ‘Pisang Masak Hijau’ en Malasia, ‘Lacatan’ en Latinoamérica, ‘Monte Cristo’ en Puerto Rico, ‘Guineo Gigante’ en las Antillas, ‘Filipino’ en Ecuador. Este cultivar de elevada altura tiene escasa importancia comercial, excepto en Centroamérica.

2.3.2 Cultivares de plátano ‘Subgrupo Plantain’.

A los plátanos de este grupo se los caracteriza por ser largos, curvos, y muy ricos en almidón, algunos particularmente grandes como los de tipo ‘Horn’ que son de tamaño y forma de cuernos de toro, desarrollan un brote pequeño o inexistente debajo del racimo (poniendo toda su energía en la enorme fruta), mientras que los de tipo ‘French’ generalmente desarrollan un brote más grande y lo retienen, características intermedias se encuentran en el ‘French Horn’ y ‘False Horn’ (Swennen, 2000).

2.3.2.1 Tipo French Plantain.

Denominado también plátano tipo Francés, existen nueve formas conocidas cultivadas en diferentes zonas tropicales y subtropicales en el mundo, entre ellas están ‘Plátano Hembra’ en México, República Dominicana, ‘Plátano Dominicano’ en Colombia y Ecuador. Las características morfológicas que distinguen al grupo son los numerosos frutos y la persistencia de la parte masculina de la inflorescencia.

2.3.2.2 Tipo Horn Plantain.

Denominado también plátano tipo Cuerno, se cultivan en Asia meridional, Latinoamérica, donde recibe diferentes sinonimias. Se identifican algunas formas conocidas cultivadas, entre ellas están ‘Plátano Macho’ en México, ‘Plátano Currare’ en Costa Rica, ‘Plátano Hartón’ en Colombia y Ecuador. Cada variedad puede ser encontrada en la forma gigante y enano, en lo que respecta a la altura de la planta. Estos plátanos se caracterizan por tener pocos frutos y la temprana degeneración de la parte masculina de la inflorescencia y de las partes florales (Brown, et al., 2013)

2.3.2.3 Tipo False Horn.

Denominado también plátano tipo Falso Cuerno. Se identifican algunas formas conocidas cultivadas en zonas tropicales y subtropicales, entre ellas están ‘Plátano Dominico-Hartón’ (sinonimia ‘Plátano Currare enano’ en Centroamérica), ‘Maricongo’ en Colombia, ‘Plátano Barraganete’ en Ecuador, ‘Macho x Hembra’ en República Dominicana. Estos plátanos se caracterizan por tener una cantidad intermedia de frutos y el eje floral masculino de manera semi-persistente (Ploetz, Kay, Daniells, & Nelson, 2007).

2.3.2.4 Tipo French Horn.

Ploetz et al. (2007) describen a estos cultivares como plátanos de tipo Cuerno Francés, y han reportado algunos ejemplares, entre ellos ‘Mbang Okon’, y ‘3 Vert’ en África.

2.4 Importancia y producción de los bananos y plátanos

El plátano y el banano (*Musa* AAB y *Musa* AAA, respectivamente) son cultivos de importancia por su valor económico y aporte nutricional a la población. Son considerados además, una importante fuente de ingresos directos e indirectos para quienes cultivan y cosechan sus frutos en todo el mundo (Alvarez, 2013).

Según INIAP, (2015) el cultivo de plátano en Ecuador, genera fuentes estables y transitorias de empleo, proporciona permanentemente alimentos ricos en energía a la

mayoría de la población rural. En las estadísticas del INEC, (2011) se reporta en el país una superficie que sobrepasa las 150 000 ha de plátano, donde más de la mitad están bajo el sistema de monocultivo y las restante están asociadas con otros cultivos. La mayor zona de producción de esta musácea se encuentra en la zona conocida como el triángulo platanero, conformado por las provincias de Manabí, Santo Domingo y Los Ríos con 52 612, 14 249 y 13 376 ha aproximadamente. Los principales cultivares que se siembran son ‘Dominico’, que se lo destina primordialmente para el auto-consumo y ‘Barraganete’ que se lo destina a la exportación, estimándose que anualmente se exportan alrededor de 90 000 toneladas (INIAP, 2015).

Según datos de TRADEMAP, (2014) Ecuador logró ocupar el segundo puesto de países exportadores de plátano por abastecer más del 17 % de frutas al mercado internacional. Teniendo como destino Estados Unidos con un 62 % del volumen total, seguido por el bloque de países de la Unión Europea con el 21 %, y el 15 % al resto del mundo.

La producción de banano posee más significancia que la del plátano, ya que genera mucho más fuentes de trabajo, su producción y exportación sobrepasa los 250 millones de cajas al año, por lo que es considerado el segundo rubro de mayor venta en el país, actualmente se reportan alrededor de 214 000 ha, en su mayoría, tecnificadas y con certificaciones de estándares internacionales de calidad (PRO ECUADOR, 2015).

Una tercera parte de las exportaciones mundiales se produce en Ecuador, abasteciendo de frutas a la Unión Europea con 42 % de la demanda, Estados Unidos con el 21 %, mercados marginales (Medio Oriente, Europa del Este, África del Norte y Asia) el 11 % y el resto del mundo con el 27 %. Según datos de AEBE, se exportaron alrededor de 240 millones de cajas (situación hasta septiembre del 2015) representado un ingreso de alrededor de 1 500 millones de dólares al sector (AEBE, 2015).

A pesar que ambos cultivos son imprescindibles para el desarrollo de la economía del país sus producciones excepcionales son vulnerables a daños colaterales, en la última

década, las plagas, enfermedades, condiciones ambientales adversas, entre otras causas, han ganado mucho espacio, poniendo en peligro la hegemonía productiva del país. Por lo que, se hace necesario de una alternativa que conserve y abastezca de material con calidad genética y fitosanitaria al sector agroproductivo.

2.5 Conservación del germoplasma vegetal

La conservación del germoplasma vegetal es considerada como una actividad científica, propuesta en el año 1970 con la finalidad de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad de las especies cultivables partiendo de la conservación de una amplia gama de genes de interés; sin embargo, estos son limitados y perecederos, por lo que, conservarlos proporcionarían la materia prima para trabajos de cultivo de tejidos, ingeniería genética o mejoramiento convencional. Puesto que, la utilización de métodos que capten la máxima diversidad de genotipos junto al uso de técnicas eficientes de multiplicación son importantes para amenorar sus pérdidas a través del tiempo (Sánchez & Jiménez, 2010).

En la actualidad se conoce que la conservación de los recursos fitogenéticos cuenta con dos formas básicas, la *in situ* y la *ex situ*. La conservación *in situ* se describe como la conservación de los ecosistemas y al mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies cultivables o domesticadas dentro de su hábitat natural o cercano al lugar en donde hayan desarrollado sus propiedades distintivas. La conservación *ex situ*, por el contrario, es la conservación de los componentes de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural, este tipo de conservación es apropiada para especies cultivadas y sus parientes silvestres, mientras que la conservación *in situ* es especialmente para especies silvestres y variedades locales de una huerta, parcela agrícola o hacienda (Scocchi & Rey, 2010).

2.6 El cultivo de tejidos en la conservación del germoplasma

El principio de la totipotencialidad de las células vegetales con el desarrollo de plantas completas a partir de un explante (células, tejidos u órganos) aislado de agentes patógenos, permitió pensar en la conservación del germoplasma mediante el cultivo de tejidos vegetales (García, 2007).

La propagación in vitro concede a los bancos de germoplasma la habilidad de multiplicar plantas en grandes cantidades cuando sea necesario. La técnica ha proporcionado resultados satisfactorios para especies recalcitrantes o de propagación vegetativa que las técnicas convencionales (bancos de campo) no ofrecen. En la última década, las metodologías para especies tropicales incluyendo a las del género *Musa*, van en aumento, y las tasas de multiplicación son excepcionales.

2.7 Tipos de conservación in vitro

La conservación del germoplasma mediante establecimiento de un banco in vitro es una alternativa complementaria a las colecciones de campo, puesto que ofrece la posibilidad de almacenar y evaluar fácilmente un elevado número de muestras en un área reducida, no requiere de elevados costos para el mantenimiento y son eficientes para mantener fuentes de propagación de alta calidad genética y fitosanitaria ya sea para programas de investigación o para fines comerciales. Además, facilita el intercambio de material genético, simplificando los procedimientos de cuarentena para sitios con regulaciones fitosanitarias muy estrictas.

Los bancos in vitro están situados en condiciones controladas de laboratorio, e involucran diversas técnicas de cultivo in vitro. La unidad de colección que se mantiene puede ser la semilla botánica o explantes vegetativos, dependiendo del hábito de crecimiento de la especie a conservar (Tyagi, Agrawal, Mahalakshmi, Hussain, & Tyagi, 2007).

Pueden clasificarse según su permanencia: “a corto plazo” y “a largo plazo”. En el primer caso, generalmente se utilizan técnicas de cultivo in vitro en condiciones de baja luminosidad y metabolismo reducido, mientras que, en el segundo se utiliza únicamente la crioconservación (Cousins & Adelberg, 2008).

2.7.1 Conservación in vitro a corto plazo.

En la conservación a corto plazo los explantes permanecen in vitro hasta por un año, donde se manipulan las condiciones de cultivo para disminuir la división celular y el metabolismo, deteniendo finalmente el crecimiento de la planta y extendiendo su longevidad, explicado de otra manera, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución de la velocidad con que ocurren los mismos, teniendo como consecuencia la reducción de la frecuencia de transferencia de las plantas a un nuevo medio de cultivo (Roca, Escobar, & Mafla, 1994).

Henshaw, (1982) describe que la disminución de la frecuencia de subcultivos, puede tener un efecto favorecedor sobre la estabilidad genética del cultivo, ya que al disminuir la tasa de división celular se puede reducir la frecuencia de mutaciones que podrían ocurrir durante la duplicación del ADN en la fase mitótica del ciclo celular.

No obstante, Pocasangre, (1992) difiere de este conocimiento manifestando que existe un riesgo potencial, ya que la misma técnica podría introducir nuevos peligros de selección debido al inevitable estrés fisiológico impuesto por la técnica in vitro, incrementando la posibilidad de inducción de alteraciones hereditarias durante el proceso, siendo inaceptable ya que el material conservado debe ser representativo al material utilizado.

2.7.2 Crioconservación.

La crioconservación es reconocida como una excelente herramienta de formidable potencial para el almacenamiento del germoplasma a mediano y largo plazo, descrita por González-Arno & Engelmann, (2013) como una disciplina científica relativamente nueva, y considerada como el método de conservación más estable.

Los albores de la crioconservación datan del año 1960, cuando el profesor Akira Sakai demostró que ciertas yemas latentes podrían resistir la inmersión directa en nitrógeno líquido, y fue en 1968 cuando se publicó el primer reporte de crioconservación de material vegetal in vitro (Quatrano, 1968). Dos décadas después, Thinh et al, (1999) reportaron la

crioconservación de puntas apicales (micromeristemas) de banano obteniendo porcentajes de regeneración bajos e impredecibles. En el año 2005 la universidad católica de Leuven, Bélgica logró porcentajes satisfactorios utilizando las técnicas modernas de vitrificación, y en consecuencia, se han desarrollado numerosos protocolos para una amplia gama de bananos y plátanos (Sakai & Engelmann, 2007) de genotipos comerciales y silvestres (Torres, Román, & González, 2011).

En la actualidad, se conoce que Biodiversity International (antes INIBAP) posee una amplia colección de germoplasma de *Musa*, donde más de la mitad de las accesiones mantenidas se conserva de manera segura en nitrógeno líquido. En Ecuador se han reportado iniciativas de crioconservación (situación a finales del 2009) una de ellas fue propuesta por el programa VLIR-ESPOL (*Tools for an environmental friendly banana production*) donde se registra la crioconservación de 15 accesiones de diferentes genotipos de bananos y plátanos procedentes del banco de germoplasma mundial.

El método de crioconservación consiste en llevar el material biológico desde su temperatura fisiológicamente activa, hasta temperaturas ultra bajas por medio del nitrógeno líquido (-196 °C) donde la división celular y los procesos metabólicos cesan, por lo que el material puede permanecer almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones genéticas (Reed, 2008). Según Engelmann, (2010) hasta el presente no existe reporte que confirme la existencia de modificaciones en las características fenotípicas, a nivel bioquímico, cromosómico o molecular que sean atribuidas a la crioconservación.

Marco & Serrano, (2012) describen que la técnica puede ser fácilmente aplicada a cualquier tipo de tejido vegetal con potencial de regeneración. No obstante, el éxito del proceso dependerá de la preparación que se dé a este para que resista tanto al congelamiento como el descongelamiento, tal preparación consiste en provocar una deshidratación protectora en las células y tejidos de manera que se evite o disminuya la formación de cristales de hielo que causan graves daños en las membranas (Abdelnour, 1999).

Otro factor que se considera regla general es que el material debe ser escogido en estado juvenil, las células meristemáticas en activa división son más resistentes a las bajas temperaturas por tener un tamaño pequeño, citoplasma denso y pocas vacuolas, razón por la cual, el contenido de agua intracelular es bajo, consideración importante para evitar daños durante el transcurso de la congelación.

2.7.3 Consideraciones para la crioconservación del germoplasma.

Según Le Bras, Le Besnerais, Hamama, & Gaprin, (2014) un fenómeno importante a tener presente para llevar a cabo una crioconservación exitosa, es la cristalización, definida como el paso de un estado líquido desorganizado a uno ordenado. Paralelo a esto, las soluciones muy concentradas y altamente viscosas inhiben la nucleación o unión de las moléculas de agua para formar hielo, por lo que a temperaturas ultra bajas se convierten en un sólido amorfo (vítreo) que evita los daños mecánicos y contribuye a mantener la viabilidad de las células y los tejidos en general (Benson, 2008).

Según Engelmann, (1997) este proceso denominado ‘vitrificación’, (ya mencionado anteriormente) es la base del éxito de la crioconservación y determina los métodos criogénicos más modernos. El sólido amorfo que se forma es desorganizado y presenta una mínima presión de vapor de agua que el correspondiente sólido cristalino, y no permite la sobre-deshidratación causada por la congelación extracelular. El estado vítreo además disminuye la contracción celular, el aumento de la concentración de solutos internos y la alteración del pH de las células (Franks, 2003).

Durante el transcurso de la congelación, las células pasan por daños o mecanismos bioquímicos específicos, con la finalidad de eliminar el agua libre o congelable (Dumet & Benson, 2000), en el transcurso, dicho material estará sometido a severas condiciones de estrés, el hídrico, inducido por la deshidratación, y el térmico, provocado por el enfriamiento (González-Arno & Engelmann, 2013).

Por otro lado, el estrés inducido promueve la producción de radicales libres (hidroxilo, superóxido y el peróxido de hidrógeno) los cuales atacan la fracción lipídica de

las membranas, provocando la formación de peróxidos de lípidos (malondialdehidos y el hidroxi-2-nonemal) altamente inestables que terminan en productos tóxicos de la oxidación secundaria (Adams, et al., 1999).

Buitink, Hoekstra, & Leprince, (2002) manifiestan que, muchas plantas acumulan osmolitos orgánicos en respuesta a condiciones ambientales de estrés como la sequía, la congelación, y el choque osmótico. Evidenciaron que existe una estrecha interrelación entre los mecanismos de protección/tolerancia y la acumulación intracelular de altos niveles de estos osmolitos denominados solutos compatibles. En consecuencia, las metodologías toman en cuenta, estimular el incremento de estos compuestos con la finalidad de abatir el estrés inducido.

La utilización exógena de sustancias crioprotectoras puede adicionarse en los medios de cultivo específicos, o realizando tratamientos con soluciones que las contengan, propiciando el ingreso de algunos de ellos a las células y, a su vez, contribuyendo a regular el equilibrio osmótico, incrementar la viscosidad y a sustituir las moléculas de agua eliminadas por la deshidratación. De esta forma, se ejerce un efecto coligativo protector que aumenta la osmolalidad celular, baja el punto de fusión por el descenso crioscópico y lleva a cabo el fenómeno de la vitrificación (Benson, 2008).

No obstante, el ajuste osmótico a través de la biosíntesis y/o acumulación de osmolitos es muy distinto y no se puede relacionar por una concentración efectiva absoluta para todos los casos, requiriendo ser ajustada para un protocolo eficiente de crioconservación (Hare, Cress, & Staden, 1998).

Fahy, MacFarlane, & Meryman, (1984) describen a la transición vítrea como el paso directo de la fase líquida muy viscosa a la de un sólido amorfo o vítreo, pero este estado depende de tres factores importantes: el contenido de agua, la temperatura y la composición química del crioprotector. Sakai, (2004) menciona que se han formulado diferentes mezclas vitrificadoras para plantas conocidas como PVS (por su denominación en inglés: plant vitrification solutions), estas mezclas son aplicadas de manera exógena y combinan la

capacidad penetrante y no penetrante de sus componentes al medio intracelular, facilitando la ocurrencia de la transición vítrea durante el congelamiento rápido de las muestras en el nitrógeno líquido. La solución PVS subenfria fácilmente por debajo de los 100 °C, y muestra una transición vítrea a -115 °C, con una desvitrificación exotérmica a -75 °C y un punto de fusión endotérmica a -36 °C (Sakai & Engelmann, 2007). Entre los compuestos que la conforman destacan el glicerol (estabilizador de membranas), el DMSO (Inmovilizador de radicales libres), el etilenglicol (efecto higroscópico) y la sacarosa (estabilizador de proteínas).

2.7.4 Métodos de vitrificación.

El método de vitrificación y sus derivados, son elegidos como los más adecuados para crioconservar estructuras vegetales organizadas, su utilización para congelar meristemas apicales de especies tropicales ha proporcionado resultados casi excepcionales (González-Arno, Martínez-Ocampo, & Molina, 2009).

Las nuevas variantes derivadas del método de vitrificación convencional como la gota-vitrificación y la crio-lamina, han permitido avanzar en el mejoramiento de los tratamientos crioprotectores (Gámez-Pantrana, Martínez-Ocampo, Beristain, & González-Arno, 2004), gracias a esto, se ha logrado la simplificación del procedimiento cuando se trabaja con grandes volúmenes de muestra (Yamamoto, Rafique, Fukui, Sekizawa, & Niino, 2012) siendo más recientemente, aplicada a la optimización a nivel de bancos de germoplasma (Panis, Piette, André, Houwe, & Swennen, 2011).

El principio del método de vitrificación consiste en inducir una intensa deshidratación osmótica del material (sin causar lesión) con la ayuda de mezclas crioprotectoras muy concentradas, con la finalidad de ser capaz de vitrificar durante la inmersión en N₂ líquido. Para que los tejidos adquieran mayor tolerancia frente a la deshidratación con la PVS y a la crioconservación, antes se realiza un tratamiento breve, el cual se denomina “tratamiento de carga” en el que se utiliza una mezcla de 0,4 M de sacarosa + 2 M de glicerol. El calentamiento y retorno a la temperatura estable del cultivo se realiza de forma rápida, con la finalidad de evitar el crecimiento de cristales de hielo. El lavado de

los crioprotectores se lleva a cabo con una solución RS (Recovery Solution) que contiene el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) líquido suplementado con 1,2 M de sacarosa, finalmente el material es puesto en condiciones apropiadas para su recuperación (Sakai & Engelmann, 2007).

2.7.4.1 Gota-vitrificación.

Esta técnica (droplet-vitrification) se deriva de la técnica de congelación de gotas desarrollado por Kartha, Leung, & Mroginski, (1982) y se diferencia del procedimiento clásico de vitrificación, en que se logra una ultra rápida velocidad de enfriamiento y de calentamiento de las muestras, dado que en lugar de usar crioviales, los tejidos se disponen en una gota o a un volumen muy reducido (15 μ L) de la solución vitrificadora colocada sobre una pequeña lamina de aluminio, en la que son inmersas directamente en nitrógeno líquido (Panis, Piette, & Swennen, 2005).

Para el calentamiento, la lámina con las muestras se sumergen directamente en abundante medio de cultivo líquido suplementado con 1,2 M de sacarosa a temperatura ambiente. La magnífica conductividad térmica de la lámina de aluminio, asociada al poco volumen de la solución crioprotectora en contacto con los tejidos, favorece que tanto el enfriamiento como el calentamiento transcurran a una velocidad muy elevada (Sakai & Engelmann, 2007).

2.7.4.2 Encapsulación-vitrificación y método de la crio-lámina.

Estos dos protocolos criogénicos son operacionalmente simples, aunque han sido aplicados a un limitado número de casos para ápices meristemáticos de *Musa*. Involucran inicialmente la encapsulación de los tejidos en alginato de calcio (biopolímero), en la encapsulación-vitrificación las cápsulas sintéticas tienen forma redondeada, al igual que las obtenidas con la técnica de encapsulación-deshidratación y fusionan sus ventajas de ser rápidamente aplicado y fácilmente manipulado.

Por otro lado, en el método de crio-lámina, la encapsulación se refiere a una capa fina de alginato de calcio que gelifica sobre la superficie de una lámina de papel aluminio e inmoviliza los tejidos sobre ella, facilitando el proceso de inmersión (Yamamoto, et al., 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) en la ciudad de Guayaquil, Ecuador.

3.2 Material vegetal

Para los trabajos de crioconservación, el material vegetal fue recolectado en plantaciones comerciales (relativamente jóvenes de 4-5 años), ubicadas en los cantones Vinces y Baba de la provincia de Los Ríos. Se seleccionaron 30-40 vástagos por cultivar de banano (AAA) 'Williams' y 'Valery' del subgrupo 'Cavendish', y plátano (AAB) 'Barraganete' del subgrupo 'Plantain'. Se escogieron hijos sanos y vigorosos de 30-45 cm de altura y de un peso aproximado de 500 g.

3.3 Etapa de introducción

El material vegetal fue introducido y establecido *in vitro* de acuerdo al protocolo establecido por Korneva, Ortega, Santos, & Peralta, (2010) y modificado por el laboratorio de cultivo de tejidos de CIBE-ESPOL. Durante el proceso a los vástagos (cormos) se le redujeron las partes externas hasta obtener secciones de 5 cm de largo y 3 cm de diámetro (domo meristemático). El cual fue lavado en un flujo de agua potable, posteriormente fue sometido a desinfección en una solución de cloro comercial diluido en agua destilada hasta la concentración final de 2 % durante 20 minutos, seguido de tres a cuatro lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, en condiciones asépticas (flujo laminar) con ayuda de un bisturí, los explantes fueron reducidos a segmentos de 1 cm de altura por 1 cm de base.

3.4 Etapa de establecimiento *in vitro*

Para el establecimiento del cultivo, los explantes fueron colocados en un medio de cultivo sólido MS (Murashige & Skoog), suplementado con 4,43 μ M de BAP. La fase de iniciación tuvo una etapa de incubación de 30 días en condiciones de temperatura y luminosidad ($26 \pm$

2 °C, con 2 500-3 000 Luxes). Los medios se ajustaron a 5,9 de pH y los parámetros de esterilización fueron a 121 °C con una presión de 1,05 kg/cm² durante 20 minutos.

3.5 Etapa de multiplicación in vitro

Terminada la etapa de establecimiento, los explantes se subcultivaron en un medio de multiplicación MS, suplementado con 10,65 µM de BAP y 1 µM de AIA, esta fase tuvo un periodo de 60 a 90 días, donde los repiques (subcultivos) se realizaron cada 30 días para incrementar la cantidad suficiente de vitroplantas.

3.6 Etapa de enraizamiento

Las vitroplantas obtenidas fueron colocadas en un medio sólido MS modificado con 0,17 M de sacarosa (PCM), desprovisto de reguladores de crecimiento, por un periodo de 30 a 45 días con el fin de inducir el enraizamiento-engrosamiento para poder extraer micromeristemas capaces de soportar las bajas temperaturas. Durante esta fase, los explantes fueron incubados a temperatura de 28 ± 2 °C, con 70 % de humedad relativa, con fotoperiodos de 16 horas y una intensidad lumínica de $50 \mu\text{E mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

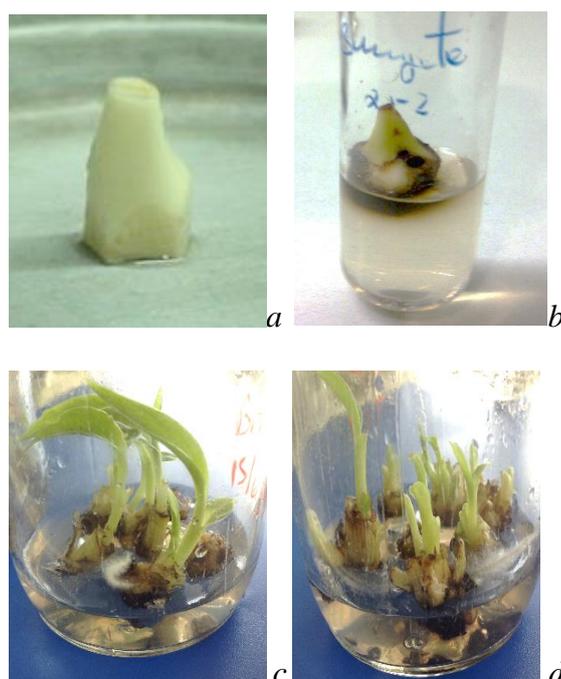


Figura 1. Etapas del cultivo in vitro de plátano ‘Barraganete’: a. introducción; b. establecimiento in vitro; c. propagación; d. enraizamiento.

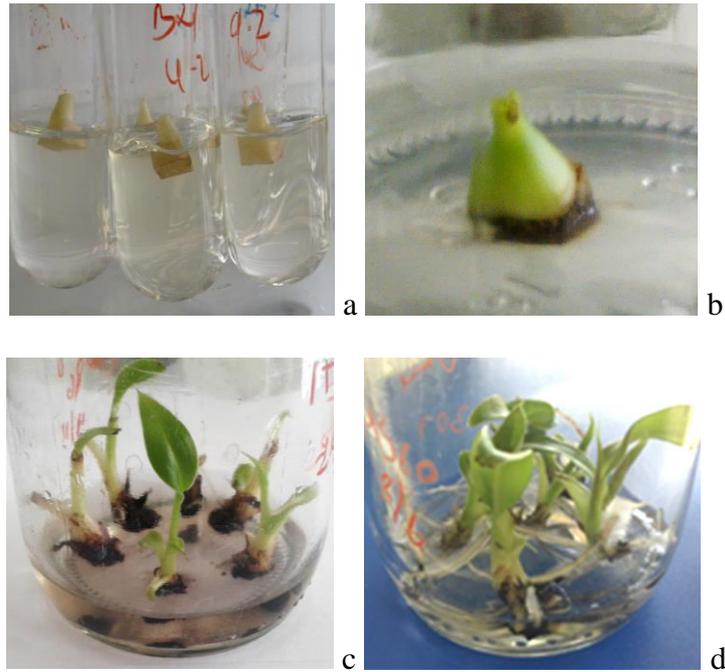


Figura 2. Etapas del cultivo in vitro de banana ‘Williams’: a. introducción; b. establecimiento in vitro; c. propagación; d. enraizamiento.

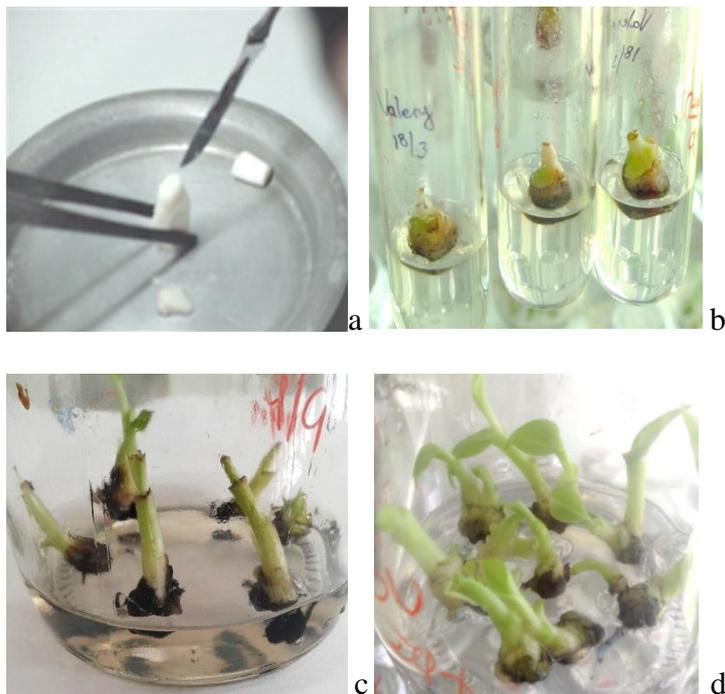


Figura 3. Etapas del cultivo in vitro de banana ‘Valery’: a. introducción; b. establecimiento in vitro; c. propagación; d. enraizamiento.

3.7 Etapa de crioconservación

3.7.1 Extracción de los micromeristemas.

Se seleccionaron las vitroplantas robustas y con buen sistema radicular de cada cultivar, y en condiciones asépticas (flujo laminar) con ayuda de un estereomicroscopio tuvieron una disección, donde se eliminaron las hojas, raíces y partes de las vainas hasta la cúpula apical y extraer así el micromeristemo (unidad experimental) del tamaño de 1x1x1 mm. Durante la disección, los explantes fueron colocados en medio líquido MS suplementado con 0,17 M de sacarosa hasta concluir con la extracción.

Todo el material de vidrio (cajas petri, fiolas y pipetas Pasteur), papel de filtro whatman y crioviales, fueron esterilizados en autoclave a temperatura de 121 °C y una presión de 1,05 kg/cm² durante 30 minutos.

3.7.2 Pre-tratamiento.

Los micromeristemas extraídos fueron colectados con ayuda de una pipeta Pasteur plástica de 3 mL, para ser colocados en una solución de carga LS1 (Loading Solution) que consiste en un medio líquido MS más la adición de 2 M de glicerol y 0,4 M de sacarosa. Luego de 20 minutos de carga a temperatura ambiente, los micromeristemas fueron transferidos a la solución PVS2, previamente enfriada en hielo a 0 °C, la cual contiene un medio líquido MS, 3,26 M de glicerol, 2,42 M de EG, 1,9 M de DMSO y 0,4 M de sacarosa (Sakai, Kobayashi, & Oiyama, 1990). Los explantes tuvieron un periodo de 30-40 minutos en esta solución crioprotectora.

Tabla 1. Composición de las soluciones crioprotectoras.

| <i>Solución</i> | <i>Componentes</i> | <i>Cantidad</i> |
|-----------------|--------------------|-----------------|
| LS1 | MS | 1,0 L |
| | Glicerol | 2,0 M |
| | Sacarosa | 0,4 M |
| PVS2 | MS | 1,0 L |
| | Glicerol | 3,26 M |
| | EG | 2,42 M |
| | DMSO | 1,90 M |
| | Sacarosa | 0,4 M |
| RS | MS | 1,0 L |
| | Sacarosa | 1,2 M |

3.7.3 Inmersión en nitrógeno líquido.

Los micromeristemas tratados con la solución PVS2 enfriada fueron colocados sobre cintas de papel aluminio (4 x 15 mm) previamente enfriadas, colocando de 8-10 micromeristemas por tira de papel y suplementados con una gota (de 15 μ L) de la solución PVS2 fría. Luego del procedimiento se colocó cada tira de papel en crioviales previamente enfriados y se sumergieron en nitrógeno líquido por un periodo de 30 minutos.

3.7.4 Post-tratamiento.

Para la descongelación, se retiraron los crioviales del nitrógeno líquido y se colocaron las cintas de papel en una caja Petri con 15 mL de la solución RS (Recovery Solution) la cual contiene un medio líquido MS, más la adición de 1,2 M de sacarosa, agitando la placa permanentemente para su rápido descongelamiento y eliminación de restos de la solución PVS2 (altamente tóxica). En esta solución los micromeristemas permanecieron por un periodo de 15 minutos y a temperatura ambiente.

3.7.4.1 Recuperación.

Después del post-tratamiento, los micromeristemas descongelados, fueron colocados en una hoja de papel filtro whatman puesto en medio semisólido, donde permanecieron durante 24 horas en la oscuridad.

Para la recuperación se modificaron las condiciones de medio de cultivo acorde a dos metodologías, la primera hace referencia al protocolo de Panis, (2009) donde se describe la utilización de un medio sólido MS más la adición de 0,3 M de sacarosa, mientras que la segunda es descrita por Korneva et al. (2009) con la utilización de un medio sólido MS reducido todos sus componentes a la mitad, más la adición de 0,08 M de sacarosa.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo de recuperación.

| <i>Medio de cultivo</i> | <i>Sales minerales</i> | <i>Reguladores de crecimiento</i> | <i>Sacarosa</i> | <i>Otros</i> |
|-------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------|
| Metodología I | Murashige & Skoog | - | 102,68 g | Phytigel 3 g pH 6,12 |
| Metodología II | ½ Murashige & Skoog | - | 30 g | Phytigel 2 g pH 6,00 |

3.7.4.2 Regeneración.

A las 24 horas después, los micromeristemas fueron transferidos al medio de regeneración sin papel filtro, permaneciendo la primera semana en la oscuridad y puestos posteriormente a las condiciones de fotoperiodo establecidas (26 ± 2 °C, con 2 500-3 000 Luxes).

Al igual que la recuperación, en esta etapa también se modificaron las condiciones de los medio de cultivo para la regeneración, la metodología I descrita por Panis, (2009) contempla la utilización de un medio MS, más la adición de 0,08 M de sacarosa y 2,22 μ M

de BAP, mientras que la metodología II descrita por Korneva et al. (2009), un medio MS con la adición de 100 mL de agua de coco y 0,08 M de sacarosa.

A continuación en la tabla 3, se describe la composición de los medios de regeneración utilizados en la regeneración.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo de regeneración.

| <i>Medio de cultivo</i> | <i>Sales minerales</i> | <i>Reguladores de crecimiento</i> | <i>Sacarosa</i> | <i>Otros</i> |
|-------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------|--|
| Metodología I | Murashige & Skoog | BAP 2,22 μ M | 30 g | Phytigel 3 g pH 6,12 |
| Metodología II | Murashige & Skoog | - | 30 g | Phytigel 2 g pH 5,9 Agua de coco 100 mL |

3.8 Variables evaluadas en la recuperación y regeneración

Se evaluó el número de micromeristemas vivos para determinar el porcentaje de sobrevivencia (N° total de micromeristemas vivos/ N° total de micromeristemas x 100), considerando como micromeristema vivo aquel que tiempo después de la descongelación en nitrógeno líquido se tornó verde y turgente. Tres meses después, se evaluó el número de micromeristemas que regeneraron una planta, para determinar el porcentaje de regeneración (N° de micromeristemas que brotaron/ N° de total de micromeristemas x 100).

3.9 Diseño experimental

Durante el desarrollo de la investigación se contó con un diseño de bloques completamente al azar, el cual involucraba un arreglo factorial de A x B, con tres niveles ('Williams', 'Valery' y 'Barraganete') para los niveles metodología I (Panis, 2009) y II (Korneva, et al., 2009).

Los tratamientos se dieron de la siguiente manera:

Factor A: Cultivares

Niveles

A1 = 'Williams'

A2 = 'Valery'

A3 = 'Barraganete'

Factor B: Metodologías

Niveles

B1 = Metodología I

B2 = Metodología II

| Tratamientos | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
|--------------|--------------|--------------|--------------|

T1 = A1B1

T2 = A1B2

T3 = A2B1

T4 = A2B2

T5 = A3B1

T6 = A3B2

La cantidad de explantes crioconservados y recuperados se describe en la tabla 4, se utilizaron 15 explantes con tres repeticiones por cultivar, considerándose un total de 60 micromeristemas distribuidos en cada tratamiento.

Tabla 4. Material experimental con tratamientos y repeticiones.

| <i>Cultivar</i> | <i>Tratamiento</i> | <i>Micromeristemas</i> | <i>Repeticiones</i> | <i>Total de micromeristemas</i> |
|-----------------|--------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 'Williams' | T1 | 15 | 3 rept de 15 micromeristemas | 60 |
| | T2 | 15 | | 60 |
| 'Valery' | T3 | 15 | Ídem | 60 |
| | T4 | 15 | | 60 |
| 'Barraganete' | T5 | 15 | Ídem | 60 |
| | T6 | 15 | | 60 |

3.10 Evaluación estadística

El efecto de la crioconservación sobre la cantidad de meristemas viables (sobrevivencia, Sm) y su capacidad de formar nuevas plantas por cada cultivar, se evaluó mediante estadística descriptiva con el objetivo de estimar las medidas de tendencia central y la dispersión de cada variable. Se aplicó la prueba F para comprobar la homogeneidad de varianzas, procediéndose con posterioridad a realizar el análisis de varianzas y la conformación de subgrupos homogéneos con el estadístico Tukey. Todas las pruebas estadísticas se realizaron al 5 % de significación y se emplearon los programas InfoStat y SPSS 12,0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento in vitro de los cultivares

Durante esta etapa los explantes de cada cultivar fueron mantenidos en condiciones controladas in vitro, su desarrollo en el transcurso fue satisfactorio, excepto por la presencia de la contaminación que se presentó al final de la etapa con porcentajes que van desde el 3 al 15% en los cultivares ‘Williams’, ‘Valery’ y ‘Barraganete’. Es de destacar que el método utilizado en la desinfección de los explantes, tuvo resultados satisfactorios a pesar de que las muestras fueron recolectadas en época lluviosa.

Tabla 5. Porcentaje de contaminación de los cultivares.

| <i>Cultivar</i> | <i>N° de explantes iniciales</i> | <i>N° de explantes contaminados</i> | <i>% de contaminación</i> |
|-----------------|--------------------------------------|---|---------------------------|
| ‘Williams’ | 30 | 2 | 6 |
| ‘Valery’ | 30 | 1 | 3 |
| ‘Barraganete’ | 40 | 6 | 15 |

4.1.1 Fenolización de los cultivos.

Descartados los explantes contaminados, todos los que se encontraban en buenas condiciones se cambiaron a medio de propagación. A los explantes se les observó engrosamiento en el tejido meristemático con oxidación moderada en la zona de reserva, el resto mantenía coloración verde con aumento de tamaño y masa vegetativa, en la figura 4 puede observarse dos ejemplos:

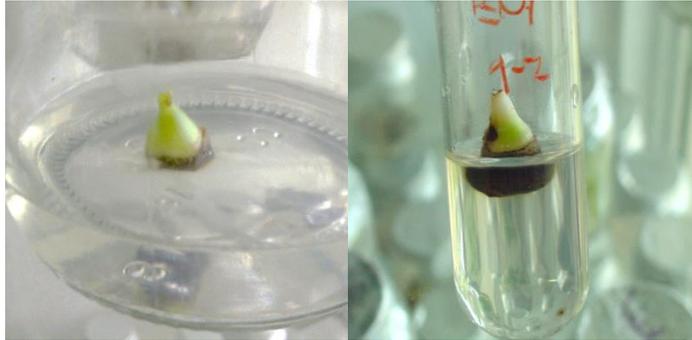


Figura 4. Explantes en etapa de establecimiento in vitro.

Los explantes cultivados presentaron oxidación fenólica que promedió entre ligeramente oxidado y moderadamente oxidado; para el cultivar ‘Barraganete’, el porcentaje de muerte por necrosis fue del 15 %, ‘Williams’ 3 % y ‘Valery’ con oxidación moderada. Según describe Cajauri, (2007) los diferentes grados de oxidación observados en los explantes, se expresan siguiendo la siguiente escala: Ligeramente oxidado (++) , moderadamente oxidado (+++), oxidado (++++) y necrótico (+++++). Estos resultados concuerdan con Angarita y Perea, (1984) quienes mencionan que la oxidación de polifenoles no es dificultosa para los cultivares AAA y ABB; sin embargo, para los del tipo AAB presentan mayor oxidación debido a las cantidades superiores de fenoxidasa. En la tabla 6 se describe el grado de oxidación de los cultivares.

Tabla 6. Grados de oxidación y porcentaje de muerte de meristemas.

| <i>Cultivar</i> | <i>Grado de oxidación promedio</i> | <i>% de muerte por necrosis</i> |
|-----------------|------------------------------------|---------------------------------|
| ‘Williams’ | ++ | 3 |
| ‘Valery’ | ++ | 0 |
| ‘Barraganete’ | +++ | 15 |

4.2 Multiplicación in vitro

En esta etapa el material propagado presentó una respuesta diferente entre cultivares, con respecto a la capacidad de producción de brotes (ahijamiento), los cultivares ‘Williams’ y ‘Valery’ durante tres subcultivos presentaron coeficientes de multiplicación de 2,20 y 2,12 respectivamente; sin embargo el cultivar barraganete necesitó de un subcultivo adicional para poder obtener la cantidad de vitroplantas necesarias. En la tabla 7 se muestra los coeficientes de multiplicación de cada cultivar.

Tabla 7. Resultado de la multiplicación in vitro de los cultivares.

| <i>Cultivar</i> | <i>Subcultivos</i> | | | | <i>Coefficiente de multiplicación</i> |
|-----------------|--------------------|----------|----------|----------|---------------------------------------|
| | <i>(brotes)</i> | | | | |
| | <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | |
| ‘Williams’ | 54 | 108 | 280 | - | 2,20 |
| ‘Valery’ | 58 | 118 | 264 | - | 2,12 |
| ‘Barraganete’ | 56 | 106 | 197 | 345 | 1,95 |

Estos resultados superan a los presentados por Korneva et al. (2002) quienes reportaron la multiplicación de cultivares de banano con genotipo AAA con un coeficiente de 1,86 mientras que en cultivares de plátano AAB obtuvieron 0,8.

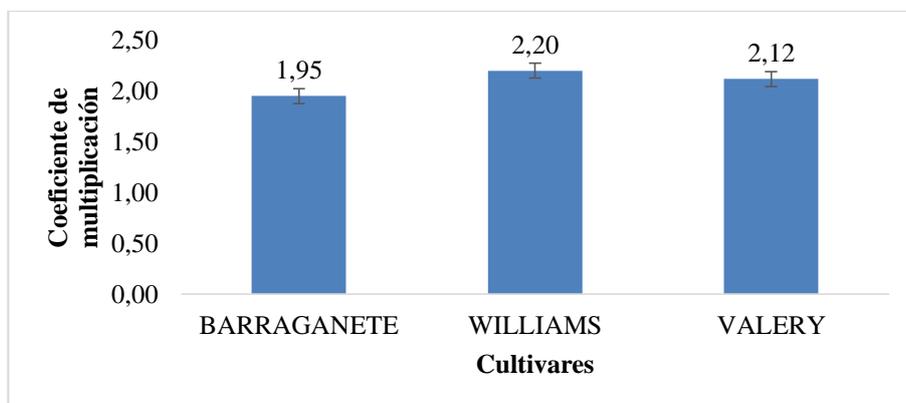


Figura 5. Coeficiente de multiplicación de los cultivares.

4.3 Enraizamiento in vitro

La inducción de raíces y engrosamiento de las vitroplantas multiplicadas tiene una estrecha relación con la necesidad de generar micromeristemas vigorosos y bien formados con la finalidad que resistan el proceso de crioconservación, esta idea coincide con Henshaw, O'Hara, & Stamp, (1985) quienes indican que el estado fisiológico de la planta donante es de particular importancia y un factor significativo, en la morfogénesis de los explantes después de la inmersión en nitrógeno líquido.

En consecuencia las vitroplantas obtenidas fueron subcultivadas en un medio MS suplementado con 0,17 M sacarosa, manteniéndose por un periodo de 30 días. Al terminar esta etapa se observó en los cultivares 'Williams' y 'Valery' características fisiológicas apropiadas; sin embargo existió una respuesta diferente en el cultivar 'Barraganete' el cual presentó vitroplantas con menor diámetro y pocas raíces, por lo que no estuvieron aptas para la extracción de los micromeristemas hasta después de una a dos semanas.

4.4 Crioconservación

4.4.1 Pre-tratamiento.

En vista de que el tiempo de extracción de los micromeristemas (6-8 minutos) dificulta tener un tratamiento uniforme con los criopreservantes, estos tuvieron que ser colocados en un medio de cultivo MS líquido con 0,17 M de sacarosa hasta completar la cantidad de explantes, esto con la finalidad de que el material tuviera un tratamiento homogéneo (Korneva, et al., 2009). A pesar que, en la literatura internacional se determina que los micromeristemas extraídos pueden estar expuestos en la solución LS1 (Loading Solution) de 20 minutos a 5 horas sin afectar su regeneración (Panis, 2009). Relacionado a esto, Takagi, (1997) describe que el mecanismo preciso de pretratamiento (LS1) aún no está entendido completamente; sin embargo se ha comprobado que el tratamiento mejora la tolerancia de los micromeristemas a la deshidratación con la solución vítrea (PVS2) (Takagi, Thinh, Islam, Senboku, & Sakai, 1997).

Durante el tratamiento con las soluciones crioprotectoras se comprobó que el uso de frascos cilíndricos de 10 mL para colocar los micromeristemas extraídos resulta poco

efectivo, dificultando la captura de los explantes suspendidos en el medio líquido. Según Panis, (2002) el tiempo de permanencia de los explantes bajo la acción tóxica del DMSO, debe ser el indicado (30 min) ya que tiempos superiores afectan la sobrevivencia luego de la inmersión en N₂L. Por esta razón, con la finalidad de disminuir variaciones, se sustituyeron los frascos por pequeñas placas Petri, que agitaron el proceso de captura para el pase a la lámina de aluminio.

4.4.2 Post-tratamiento.

Durante el post-tratamiento los micromeristemas fueron descongelados en un medio de recuperación RS (Recovery Solution) a temperatura ambiente con la ayuda de la corriente de aire estéril del flujo laminar, no se requirió la utilización de un baño termoestado por cuanto la buena conductividad térmica de la lámina de aluminio optimizó el proceso de descongelación (Sakai & Engelmann, 2007).

4.4.3 Recuperación.

Los micromeristemas descongelados fueron puestos a recuperar en condiciones de oscuridad por una semana con la finalidad de evitar la fotooxidación. Según Benson, (1990) determina que un síntoma común de daño por enfriamiento, es la susceptibilidad por la fotooxidación en plantas que crecen bajo condiciones estándares de luz y temperatura. Este tipo de daño ocasiona una degradación en el contenido del pigmento, por lo que al exponerse a la luz de manera inmediata produciría un blanqueo rápido del tejido, si es que este estuviera dañado.

Durante las primeras 24 horas de permanencia en los medios, pudo observarse fenolización alrededor de algunos explantes debido a la reacción enzimática del material, aunque la mayoría de los micromeristemas se mantuvieron de color claro por un par de días, aproximadamente al tercer día, comenzaron a fenolizarse. En la metodología I, el porcentaje de fenolización sobre los cultivares se dio de la siguiente manera: 48 % para ‘Williams’, 55 % para ‘Valery’ y 90 % para ‘Barraganete’. Mientras que, para la metodología II: 67 % para ‘Williams’, 63 % para ‘Valery’ y 72 % para ‘Barraganete’.

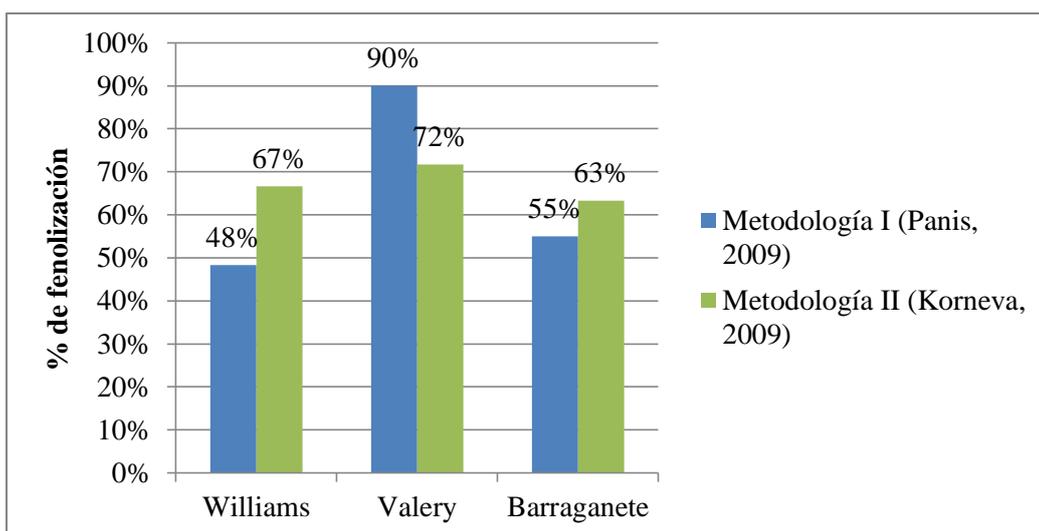


Figura 6. Porcentaje de fenolización de los cultivares.

4.4.3.1 Sobrevivencia.

Se evaluaron los parámetros de sobrevivencia de acuerdo a lo descrito por Panis, (2009) donde los micromeristemas luego de cuatro a seis semanas en el medio de regeneración pueden tener cuatro tipos de reacción.

- i. Micromeristemas blancos que son el resultado de la muerte inmediata del tejido sin ennegrecimiento;
- ii. Micromeristemas negros completa o parcialmente, indicando que hubo una reacción enzimática después de la crioconservación;
- iii. Crecimiento desorganizado de callos representando excrecencia de pequeñas áreas aisladas del micromeristema y;
- iv. Regeneración de meristemas resultando de la supervivencia de una parte sustancial del micromeristema.

En las evaluaciones visuales para la metodología I, los cultivares ‘Williams’ y ‘Valery’ presentaron una sobrevivencia del 13 y 12 %, seguido de ‘Barraganete’ con el 8 %. Mientras que en la metodología II, los cultivares ‘Williams’ y ‘Valery’ presentaron una sobrevivencia del 18 y 15 % seguido de ‘Barraganete’ con el 3 %. Los resultados del cultivar

‘Williams’ difieren de los obtenidos previamente por Korneva et al. (2004) quienes tuvieron una sobrevivencia del 34 %, por otro lado, para los cultivares ‘Valery’ y ‘Barraganete’ hasta la fecha no se han reportado datos sobre su crioconservación; sin embargo, podrían relacionarse a otros cultivares crioconservados por Panis et al. (2002) quienes obtuvieron del 14 al 27 % de sobrevivencia para los de tipo AAA, y del 5 al 35 % para los de tipo AAB.

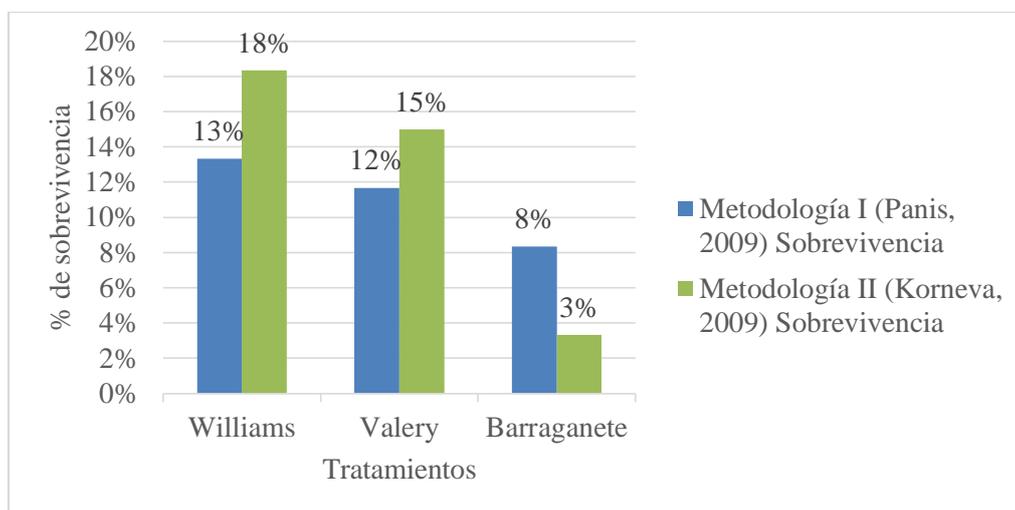


Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia de los cultivares.

El análisis estadístico de los datos experimentales con respecto a la sobrevivencia, indica que no se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las metodologías utilizadas. Los cultivares ‘Williams’ y ‘Valery’ presentaron el mejor comportamiento aplicando la metodología II, mientras que ‘Barraganete’ presentó el menor promedio sin importar la metodología. Se describe además la existencia de diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los cultivares de la metodología II.

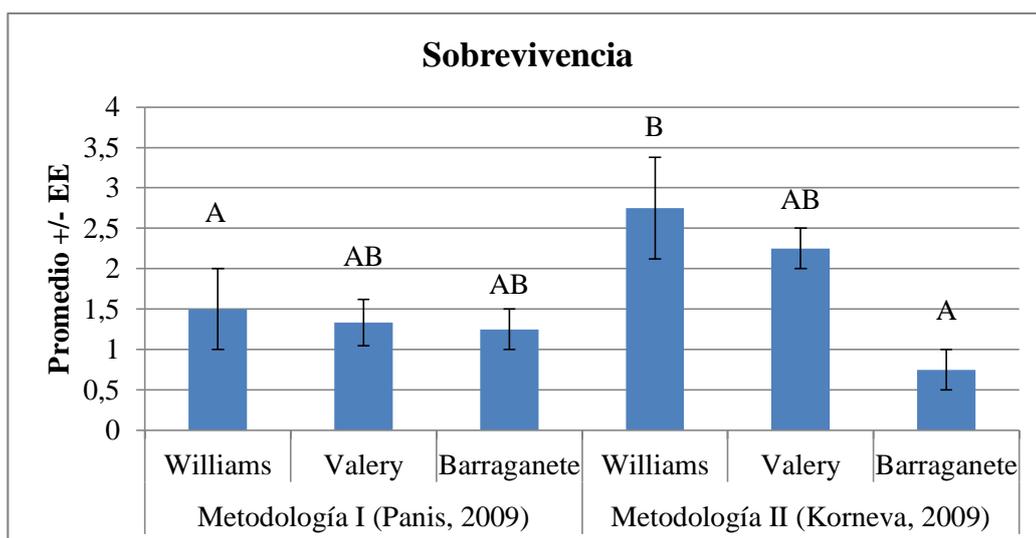


Figura 8. Comparación estadística de la sobrevivencia de los micromeristemos de cada cultivar, luego de la crioconservación.

La cantidad de sacarosa utilizada en la metodología II fue menor a la contraparte, y la utilización de BAP fue reemplazada por agua de coco. Según Crowe, (1984) la sacarosa es un protector de membranas muy eficaz, induce cambios metabólicos y fisiológicos que conducen a la crioprotección. Kendall, Kartha, Qureshi, & Chermak, (1993) describen que el compuesto puede mantener el estado cristalino de las bicapas de la membrana y estabilizar las proteínas en condiciones de congelación. En ese sentido Panis et al. (2002) y Korneva et al. (2009) pudieron haber aplicado cantidades determinantes a los medios de cultivo (0,3-0,08 M).

El efecto de esta disminución es descrito por Digilio, (2015) quien en sus estudios comprobó que la baja concentración tendría un efecto benéfico en la rehidratación del tejido crioconservado, ya que reduce paulatinamente el potencial osmótico, por lo tanto, la célula puede ir incorporando agua de manera gradual, explicado de otra manera, el cambio fisiológico no sería brusco, ocasionando menos estrés para el tejido. Por otro lado, Ayerbe, (1990) manifiesta que la adición de agua de coco a los medio de cultivo ha producido resultados sorprendentes, si se utiliza junto a la adición de auxinas produce una fuerte división celular en los tejidos.



Figura 9. Brotes recuperados de los cultivares cuatro semanas después de la descongelación.

Algunos micromeristemas descongelados que sobrevivieron presentaron inicialmente una etapa de latencia, ya que después de seis a siete semanas en medio de regeneración comenzaron a tonarse verde (tal es el caso del cultivar ‘Barraganete’ de la metodología II). Una semana antes de la evaluación algunos micromeristemas oscuros se tornaron verdes, presentando primordios foliares, como el caso de los cultivares ‘Williams’ y ‘Valery’ de la metodología II. En ningún caso se tuvo la presencia de callos que pudieran desarrollarse durante la recuperación y regeneración, caso que pudiera suceder como lo reporta Panis, (2009) en sus investigaciones, siempre la sobrevivencia fue directa.

Durante la etapa de recuperación y regeneración no se observó la presencia de agentes contaminantes, por lo que, es un indicador de que la esterilización fue óptima junto a una eficiente manipulación en condiciones asépticas, también puede tener relación a lo manifestado por Wang et al. (2008) quienes describen que la crioconservación tiene un efecto en la eliminación de bacterias, virus y otros agentes patógenos. Concerniente a esto, Helliot et al. (2003), reportaron la crioterapia para la erradicación del virus del mosaico (CMV) en plantas de banano cv. ‘Williams’ (Torres, Román, & González, 2011), obteniendo resultados satisfactorios.

4.4.3.2 Regeneración.

Con respecto a la regeneración, transcurridas las 8-10 semanas se observó la elongación del ápice y el desarrollo de brotes verdes (aproximadamente 4-6 mm de altura), durante este periodo, los micromeristemas que permanecieron oscuros o claros ya fueron dados por muertos. El porcentaje de regeneración evaluado fue respecto al número inicial de micromeristemas y no en relación al número de micromeristemas sobrevivientes.

En la figura 10 se describe el porcentaje de regeneración de los micromeristemas. En la metodología I, los cultivares ‘Williams’ y ‘Valery’ presentaron una regeneración del 18 % y 10 % respectivamente, mientras que el cultivar ‘Barraganete’ presentó una regeneración del 12 %. En la metodología II, ‘Williams’ y ‘Valery’ tuvieron una regeneración del 28 % y 18 % mientras que ‘Barraganete’ tuvo una regeneración del 7 %.

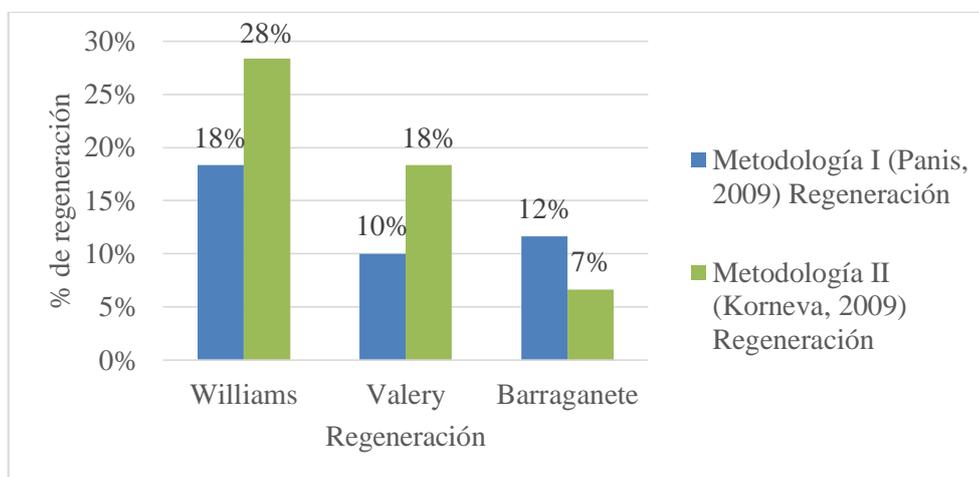


Figura 10. Porcentaje de regeneración de los cultivares.

En la figura 11 se puede observar que los mejores resultados (valores altos de regeneración) se dan en el cultivar ‘Williams’ aplicando la metodología II. Los resultados menos favorables se dan en ‘Barraganete’ sin importar la metodología utilizada.

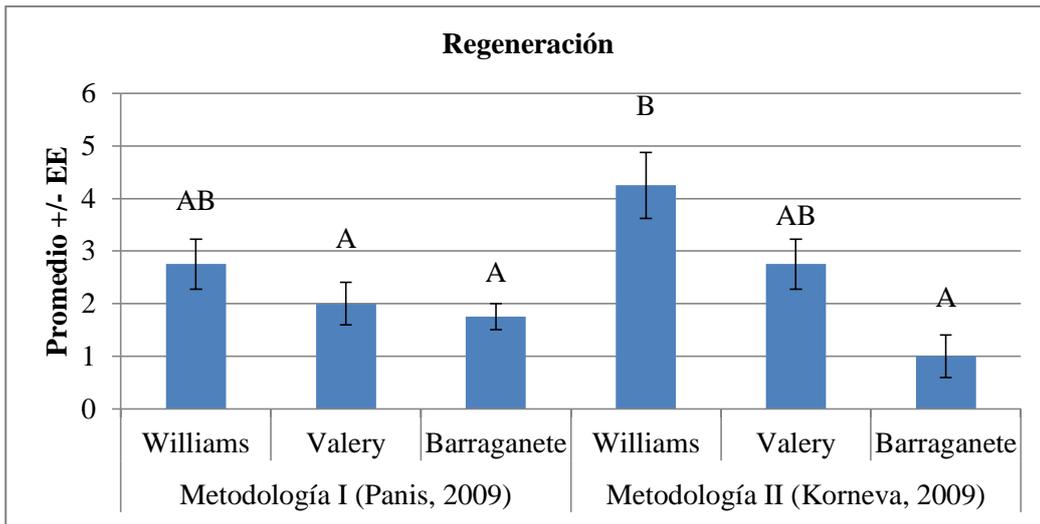


Figura 11. Comparación estadística de la sobrevivencia de los micromeristemos de cada cultivar luego de la crioconservación.

En la figura 12 se describe la comparación estadística de la sobrevivencia de los micromeristemos y la posterior regeneración de vitroplantas obtenidas en los distintos cultivares. Letras distintas difieren para ($P \leq 0,05$).

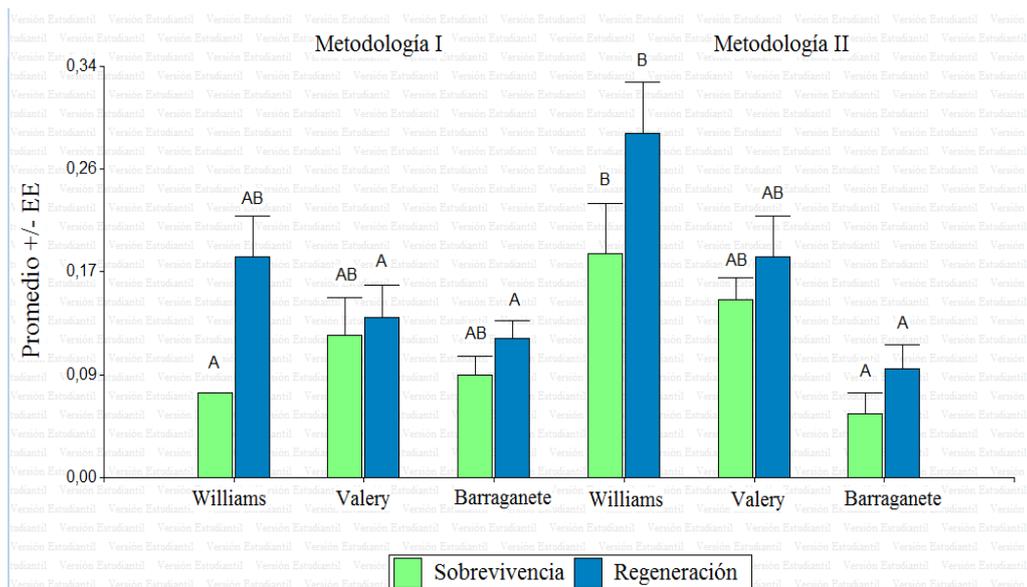


Figura 12. Comparación estadística de la sobrevivencia y regeneración de los micromeristemos de cada cultivar, de acuerdo a la metodología utilizada.

Los resultados obtenidos de ambas metodologías para la regeneración del cultivar ‘Williams’ no se aproximan a los reportados por Korneva et al. (2004) quienes obtuvieron el 34 %. Para los cultivares ‘Valery’ y ‘Barraganete’ no se han conseguido hasta la fecha reportes de su crioconservación, y aunque pudieran ser relacionados a los obtenidos por Panis, (2002) en otros cultivares de genotipo AAB (entre 5 % y 35 %) hay que tener presente que, en estudios realizados por Korneva et al. (2009) se comprobó que la regeneración corresponde a características individuales de los cultivares en respuesta a variaciones de tensión termal o estrés por frío, y no podría estar asociada con un comportamiento diferencial entre grupos genómicos, dicho de otra manera, la respuesta de las adhesiones es diferente dentro del mismo genotipo.



Figura 13. Desarrollo de brotes a partir de micromeristemos descongelados.

Según Thinh y otros, (1999) se han crioconservado un sinnúmero de genotipos de *Musa* utilizando el método de gota-vitrificación, siendo el apropiado para esta forma de cultivo (ápice meristemático) (Panis, Piette, & Swennen, 2005). Sin embargo, en la literatura internacional se menciona que el método requiere de más trabajo cuando se trata de cultivares con genoma AAB, siendo una alternativa para este caso, la utilización de agregados proliferantes obtenidos al usar un medio que contiene altas concentraciones de citoquininas (10 mg/L TDZ) (Panis, 2009). Los resultados de Korneva et al. (2009)

mostraron mayor regeneración de brotes a partir de scalps crioconservados en grupos genómicos AAA y ABB (69 % y 43 % respectivamente) y menor en el genoma AAB, con valores que promediaban el 20 %; sin embargo, la técnica de scalps no fue tomada en cuenta debido a que Pocasangre, (1992) manifiesta que el riesgo de variación somaclonal aumenta al ser utilizada.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. El protocolo de introducción descrito por Korneva, Ortega, Santos, & Peralta, (2010) logró una satisfactoria desinfección y multiplicación de los cultivares.
2. Durante la etapa de multiplicación, se obtuvo el mejor coeficiente en el cultivar 'Williams'.
3. El porcentaje de fenolización de los explantes luego de la descongelación fue alta; sin embargo no influyó en la sobrevivencia y regeneración del material.
4. La metodología II descrita por Korneva et al. (2009) dio como resultado una mayor sobrevivencia y regeneración para los cultivares 'Williams' y 'Valery'.
5. El cultivar 'Barraganete' presentó el menor promedio de regeneración sin importar la metodología.

5.2 Recomendaciones

1. Evaluar y determinar las concentraciones de los componentes de la solución PVS2 para el mejoramiento de la etapa de crioprotección
2. Evaluar el parámetro: tiempo de deshidratación y crioprotección, además del tamaño del explante.
3. Evaluar la regeneración de los explantes luego de la etapa de criopreservación utilizando sistemas de inmersión temporal (SIT); analizando parámetros tales como el volumen de medio, tipo y tiempo de inmersión.

4. Realizar un seguimiento de las plantas regeneradas luego de la criopreservación en condiciones de invernadero y de campo con la finalidad de evaluar los parámetros de rendimiento y variación somaclonal.

5. En el país existen un sinnúmero de cultivares de bananos y plátanos cuyas características genéticas aún no han sido estudiadas, por lo que es recomendable generar investigaciones en base a la temática que permitan conservarlos y así salvaguardar el germoplasma existente.

Bibliografía

- Abdelnour, A. (1999). Crioconservación de Plantas, Estado Actual de la Investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 205-214.
- Adams, L., Benson, E., Staines, H., Bremmer, D., Millam, S., & Deighton, N. (1999). Effects of the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of in vitro plants cells. *Plant Physiol*, 376-386.
- AEBE. (12 de diciembre de 2015). *Datacomex S.A.* Obtenido de aebe.com.ec: www.aebe.com.ec
- Albarrán, J., Francia, F., Fuch, M., Martínez, G., Rodríguez, A., Manzanilla, E., . . . Torrealba, M. (2011). Estrategias biotecnológicas para la conservación de germoplasma en el Inia-Ceniap Venezuela. Caso Yuca Musáceas. *Agronomía Tropical*, 85-94.
- Alvarez, E. (2013). Producción de material de siembra limpio en el manejo de las enfermedades limitantes del plátano. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*, 16.
- Ayerbe, L. (1990). Preparación y composición de los medios nutritivos. En M. Nijhoff, *Cultivo in vitro de las plantas superiores* (pág. 79). Madrid: Mundi-prensa.
- Bajaj, Y. (1987). Cryopreservation of potato germplasm. En Y. Bajaj, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (págs. 472-486).
- Benson, E. (2008). Cryopreservation theory. En B. Reed, *In Plant cryopreservation. A practical guide* (págs. 23-29). Berlín, DE: Springer.
- Benson, E., Johnston, J., Muthusamy, J., & Harding, K. (2006). Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. In: Gupta, DS; Ibaraki, Y. eds. *Plant Tissue Culture Engineering. Springer*, 441-476.
- Brown, D., Vargas, J., Jiménez, R., Rengifo, D., Fernández, J., Marcelino, L., & Dita, M. (2013). Identificación de Variedades de Plátano (Musa AAB) Cultivadas en América Latina y el Caribe. *II Congreso Latinoamericano y del Caribe de Plátanos y Bananos*, 1.

- Buitink, J., Hoekstra, F., & Leprince, O. (2002). Biochemistry and biophysics of tolerance systems. . En M. Black, & H. Pritchard, *In Desiccation and survival in plants. Drying without dying* (págs. 293-318). Oxford, UK: CABI Publishing.
- Cabrera, J., & Galán Saúco, V. (2005). Evaluation of the banana cultivars Zelig, Grande Naine and Gruesa under different environmental conditions in the Canary Islands. *CIRAD, EDP SCIENCES*.
- Cajauri, M. (2007). Evaluación morfológica e histológica del proceso de formación de temas múltiples de Musa (AAB) cv. Plátano Hartón. 19-25.
- Chin, H. (1988). Recalcitrant seeds: a status report. *IPGRI*.
- Constantine, D. (2004). *The nomenclature of the genus Musa*. Obtenido de User Global net: <<http://www.users.globalnet.co.uk/~drc/Nomenclature.htm>>.
- Coronel, M., & Henriquez, S. (2010). Adaptacion de vitroplantas de banano (Musa AAA variedad Williams) en condiciones de invernadero utilizando bio-fertilizantes. 2.
- Cousins, M., & Adelberg, J. (2008). Short - term and long - term time course studies of tumeric (*Curcuma longa* L.) microrhizome development in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 283-293.
- Crowe, J., Crowe, L., Carpenter, J., & Aurell-Winstrom, C. (1984). Stabilisation of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Plant Cell Reports*, 89-94.
- Daniells, J., Jenny, D., Karamura, D., & Tomekpe, K. (2001). Musalogue: a catalogue of Musa germplasm. Diversity in the genus Musa. *International Network for the Improvement of Banana and Plantain*.
- Diario El Universo. (13 de noviembre de 2014). Ecuador romperá récord de producción de banano. *Diario El Universo*.
- Digilio, A. (13 de Diciembre de 2015). *ResearchGate*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/260122541_CRIOCONSERVACION_DE_VARIEDADES_NATIVAS_DE_PAPA
- Dumet, D., & Benson, E. (2000). The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. *In Cryopreservation of tropical plant germplasm, JIRCAS - IPGRI*, 43-56.

- Engelmann, F. (1997). In vitro conservation methods. En B. Ford-Lloyd, J. Newbury, & J. Callow, *In Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use* (págs. 119-162). Wellingford, UK: CABI.
- Engelmann, F. (2004). Progress and Prospects. in vitro. *Plant Cryopreservation*, 427-433.
- Esterbauer, H., Zollner, H., & Schauer, R. (1988). Hydroxyalkenals: Citotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas of Sciences: Biochemistry*.
- Fahy, G., MacFarlane, D., & Meryman, H. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 407-426.
- FAOSTAT. (19 de Enero de 2011). *División de Estadísticas de la FAO*. Obtenido de <http://www.faostat.fao.org>
- Franks. (2003). Scientific and technological aspects of aqueous glasses. *Biophysical Chemistry*, 251-261.
- Fundación Produce de Guerrero. (2012). *Agencia de Innovación de plátano*. México: A.C.
- Galán Saúco, V. (2003). *Banana and Platain*.
- Gámez-Pantrana, R., Martínez-Ocampo, Y., Beristain, C., & González-Arno, M. (2004). An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. *CryoLetters*, 405-414.
- García, L. F. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*, 67-79.
- García, L., Fera, M., & Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*, 67-79.
- Golmirzaie, A., & Panta, A. (2000). Advances in Potato Cryopreservation at CIP. En F. Engelmann, & H. Takagi, *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and application* (págs. 250-254).
- Golmirzaie, A., & Panta, A. (2000). Advances in potato cryopreservation by vitrification. En F. Engelmann, & H. Takagi, *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm* (págs. 250-254).
- González-Arno, M., & Engelmann, F. (2013). Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. En M. González-Arno, & F. Engelmann, *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe* (pág. 11). San José: IICA.

- González-Arno, M., Martínez-Ocampo, Y., & Molina, J. (2009). Para conservar la biodiversidad genética vegetal. *Revista Ciencia*, 78-86.
- González-Arno, M., Panta, A., Roca, W., Escobar, R., & Engelmann, F. (2008). Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1-13.
- Hare, P., Cress, W., & Staden, J. v. (1998). Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 535-553.
- Helliot, B., Swennen, R., Poumay, Y., Frison, E., Lepoivre, P., & Panis, B. (2003). Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp) highly proliferating meristems. *Plant Cell Reports*, 690-698.
- Henshaw, G., O'Hara, J., & Stamp, J. (1985). Cryopreservation of potato meristem. *Cryopreservation of plants cells and organs*, 159-170.
- INIAP. (7 de Julio de 2015). *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*. Obtenido de http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=29:banano&catid=6:programas
- Iriondo, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigacion Agronómica Proteccion Vegetal*, 1.
- Kartha, K., Leung, N., & Mroginski, L. (1982). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 133-140.
- Keller, E., Senula, A., Leunufna, S., & Grube, M. (2006). Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration*, 411 - 417.
- Kendall, E., Kartha, K., Qureshi, J., & Chermak, P. (1993). Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using abscisic acid pretreatment. *Plant Cell*, 89-94.
- Korneva, S., Flores, J., & Santos, E. (2013). Plant regeneration of plantain "Barraganete" from somatic embryos using a temporary immersion system. *Research*, 267-270.
- Korneva, S., Maribona, R., Mendoza, J., Piña, Ruiz, O., & Maribona, R. (2009). Crioconservación de 14 variedades de *Musa* spp mediante uso de meristemas apicales y de scalps. *Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal*. Ciego de Ávila.

- Korneva, S., Ortega, N., Santos, E., & Peralta, E. (2010). Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de *Musa* spp a partir de meristemas apicales y scalps. *Congreso Internacional ACORBAT*, (págs. 351-365). Medellín.
- Lacayo, R. (2000). *Musa*, biología, manejo del cultivo y mejoramiento genético. En G. Matton, M. Vargas, & R. Swennen, *Las Musáceas* (págs. 15-16). Guayaquil: WOB.
- Le Bras, C., Le Besnerais, P., Hamama, L., & Gaprin, A. (2014). Cryopreservation of ex-vitro-grown *Rosa chinensis* 'Old Blush' buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 236.
- Marco, A., & Serrano, F. (2012). Crioconservación: herramienta para la conservación ex situ del material vegetal. *Cuadernos de Biodiversidad*, 9-12.
- Mroginski, L., Roca, W., & Kartha, K. (1991). Crioconservación del Germoplasma. En W. Roca, & Mroginski, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y aplicaciones* (págs. 715-730). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Muñoz, F. (9 de Septiembre de 2014). Cultivos Tropicales II. (G. Reyes, Entrevistador)
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. En *Physiologia Plantarum* (págs. 473-497).
- Panis, B. (2009). Crioconservación de Germoplasma de *Musa*. En F. Engelmann, & E. Benson, *Biodiversity International* (págs. 8-9). Montpellier, Francia: Biodiversity International.
- Panis, B., & Lambardi, M. (2005). Status cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). En J. Ruanes, & A. Sonnino, *The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forest, animal and fishery genetic resources in developing countries* (págs. 61-78). Turin.
- Panis, B., & Swennen, R. (1995). Cryopreservation of Germplasm of Banana and Platain (*Musa* Species). En Y. Bajaj, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (págs. 381-382). Heverlee: Springer-Verlag .
- Panis, B., Hannelore, S., Van Den Hende, S., & Swennen, R. (2002). Precultivo con sacarosa para simplificar la crioconservacion de cultivo de meristemas de banano. *CryoLetters*, 375-384.
- Panis, B., Piette, B., & Swennen, R. (2005). Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science*, 45-55.

- Panis, B., Piette, B., André, E., Houwe, I. v., & Swennen, R. (2011). Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? *Acta Horticulturae*, 157-162.
- Patiño, C. (2010). Variación somaclonal y selección in vitro con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión . *Revista de Investigacion Agraria y Ambiental*, 7-15.
- Perea, M., & Angarita, A. (1984). Proyecto para la creación del Centro Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales (CICT). *Segunda Expedición Botánica*, 169.
- Ploetz, R., Kay, A., Daniells, J., & Nelson, S. (2007). Banana and Plantain - an Overview with emphasis on Pacific Island Cultivars. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, 13-19.
- Pocasangre, E. (1992). *Conservación de germoplasma de Musa sp. in vitro y estudios morfológicos de plantas variantes de Musa (AAB) c.v. "Currare"*. Turrialba: CATIE. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=QB8OAQAIAAJ&pg=PA97&lpg=PA97&dq=pocasangre+tesis+turrialba&source=bl&ots=MSXGXZiGTj&sig=4pf3a5E9KB0cxwxG_ShEJfSZuRg&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjmm_OTgajKAhXEKx4KHUnLDD0Q6AEIGjAA#v=onepage&q=pocasangre%20tesis%20turrialba&f
- PRO ECUADOR. (12 de Noviembre de 2015). *Ministerio de Comercio Exterior Web site*. Obtenido de proecuador.gob.ec: www.proecuador.gob.ec
- Quatrano, R. (1968). Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing DMSO. *Plant Physiology*, 2057-2061.
- Rao, N. (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 136-145.
- Reed, B. (2008). Cryopreservation: A practical guide. *Springer*, 515.
- Roberts, H. (1973). Predicting the viability of seeds. *Seed Science and Technology*, 499-514.
- Robinson, J., & Galán, V. (2012). *Bananos y plátanos*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Roca, W., Arias, D., & Chávez, R. (1991). Métodos de conservación in vitro del germoplasma. *Cultivo de tejidos en la agricultura*, 697-713.
- Roca, W., Escobar, R., & Mafla, G. (1994). Conservación de germoplasma de yuca in vitro. *Principios y Tecnicas. CIAT, Cali*.

- Sakai, A. (2004). Plant cryopreservation . En B. Fuller, N. Lane, & E. Benson, *Life in the frozen state* (págs. 329-345). Boca Raton, US: CRC Press.
- Sakai, A., & Engelmann, F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. *CryoLetters*, 151-172.
- Sakai, A., Kobayashi, S., & Oiyama. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep*, 30-33.
- Sánchez, N., & Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 193-205.
- Scocchi, A., & Rey, H. (2010). Conservación del Germoplasma in vitro. En G. Levitus, R. C. Echenique, E. Hopp, & L. Mroginski, *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II* (págs. 369-370). Buenos Aires: Ediciones INTA.
- Simmonds, N., & Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London. Botany*, 302-312.
- Singh, H., Uma, S., Selvarajan, R., & Karihaloo, J. (2011). Micropropagation for Production of Quality Banana Planting Material in Asia-Pacific. *Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB)*, 92.
- Sotomayor, I. (7 de Julio de 2015). *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*. Obtenido de http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=29:banano&catid=6:programas
- Stover, R., & Simmonds, N. (1987). *Bananas*. New York: Longman Scientific & Technical.
- Streponkus, P., Langis, R., & Fujikama, S. (1992). Cryopreservation of plants tissues by vitrification. *Advances in Low-temperature Biology*, 1-61.
- Swennen, R. (2000). Importancia y tipos de Musáceas. En R. Swennen, K. Dens, & M. Vargas, *Mejoramiento en el género Musa, Objetivos y técnicas* (págs. 3-4). Leuven: VVOB.
- Takagi, H., Thinh, O., Islam, O., Senboku, T., & Sakai, A. (1997). Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. *Plant Cell Rep*, 594-599.

- Torres, M., Román, M., & González, C. (2011). Evaluación fenotípica y bioquímica de plantas regeneradas de meristemos proliferantes crioconservados de plátano (*Musa spp*). *Agrotecnia de Cuba*, 1-11.
- Tyagi, R., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z., & Tyagi, H. (2007). Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In vitro cellular and Developmental Biology-Plant*, 51-58.
- UNEP. (1992). Programa ambiental de las Naciones Unidas. *Convenio sobre diversidad biológica*, 12.
- Villalobos, & Thorpe. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En W. Roca, & L. Mroginski, *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (págs. 127-141). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Villalobos, V., & Engelmann, F. (1995). Conservación ex situ de germoplasma vegetal usando biotecnología. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 375-382.
- Wang, Q., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M., & Valkonen, J. (2008). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology*, 351-358.
- Wang, Y., Fan, M., & Liaw, S. (2005). Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica*, 29-34.
- Wilkinson, T., Wetten, A., Prychid, C., & Fay, M. (2003). Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Annals of Botany*, 65-74.
- Withers, L., Wheelans, S., & Williams, J. (1990). In vitro conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. *Euphytica*, 9-22.
- Yamamoto, S., Rafique, T., Fukui, K., Sekizawa, K., & Niino, T. (2012). V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *CryoLetters*, 12-23.
- Yamamoto, S., Rafique, T., Priyantha, W., Fukui, K., Matsumoto, T., & Niino, T. (2011). Development of cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *CryoLetters*, 256-265.

Apéndice I. Figuras



Figura 14. Plantas madres a. 'Williams', b. 'Valery', c. 'Barraganete'.

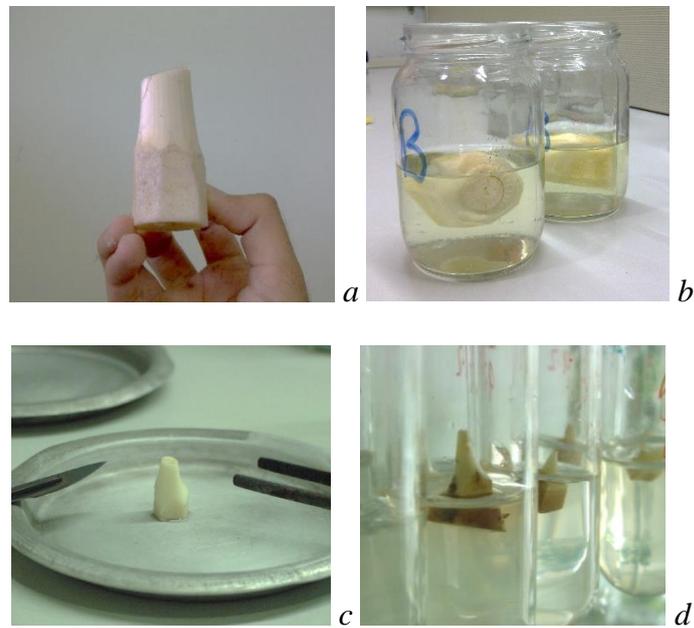


Figura 15. Etapa de cultivo in vitro; a. introducción, b. desinfección, c. disección, d. establecimiento in vitro.

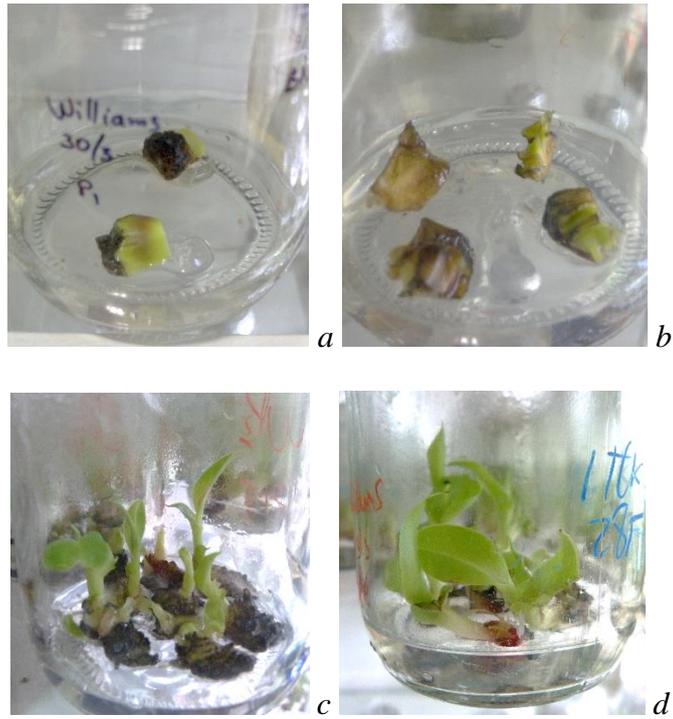


Figura 16. Etapa de multiplicación de 'Williams'; a. pase 1, b. pase 2, c. pase 3, d. enraizamiento.

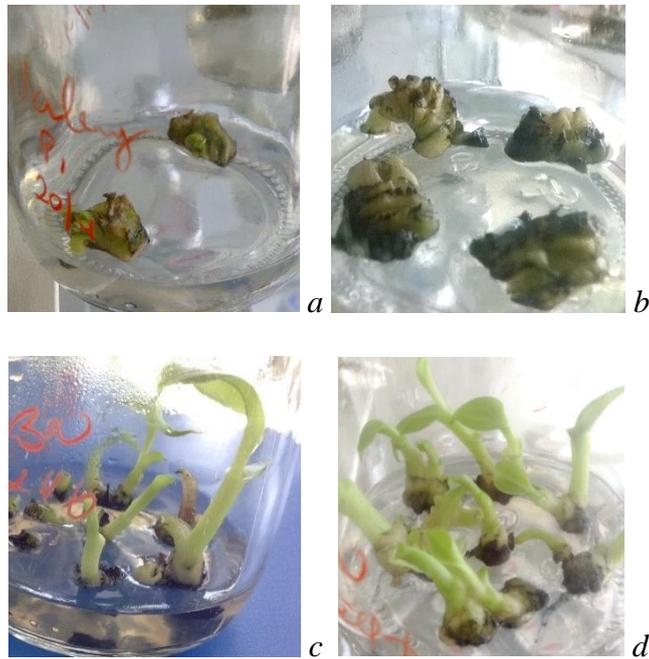


Figura 17. Etapa de multiplicación de 'Valery'; a. pase 1, b. pase 2, c. pase 3, d. enraizamiento.

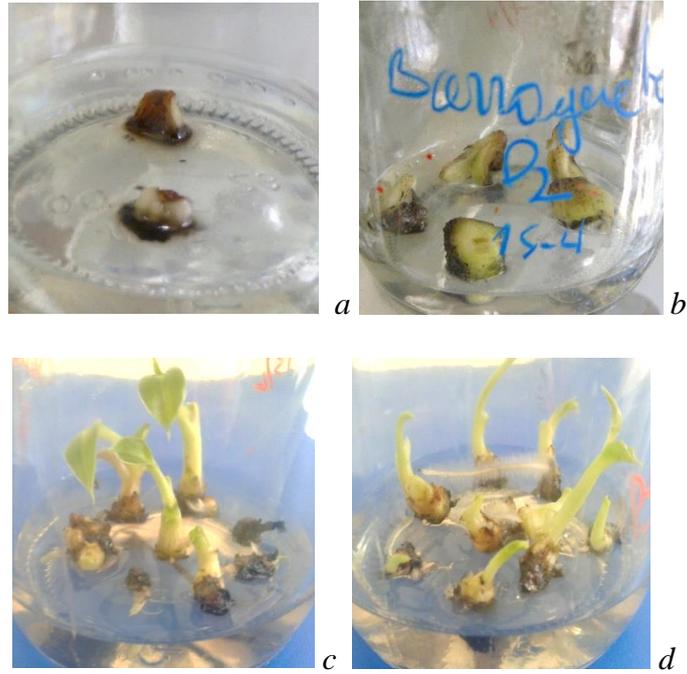


Figura 18. Etapa de multiplicación de 'Barraganete'; a. pase 1, b. pase 2, c. pase 3, d. pase 4.



Figura 19. Etapa de criopreservación; a. extracción de los micromeristemos, b. tratamiento con criopreservantes, c. goteo de la PVS2 en láminas de aluminio, d. inmersión en N_2L .

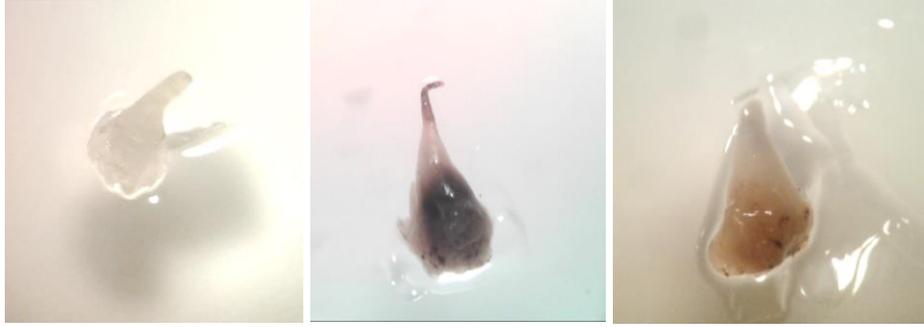


Figura 20. Reacción de los micromeristemos después de la crioconservación.

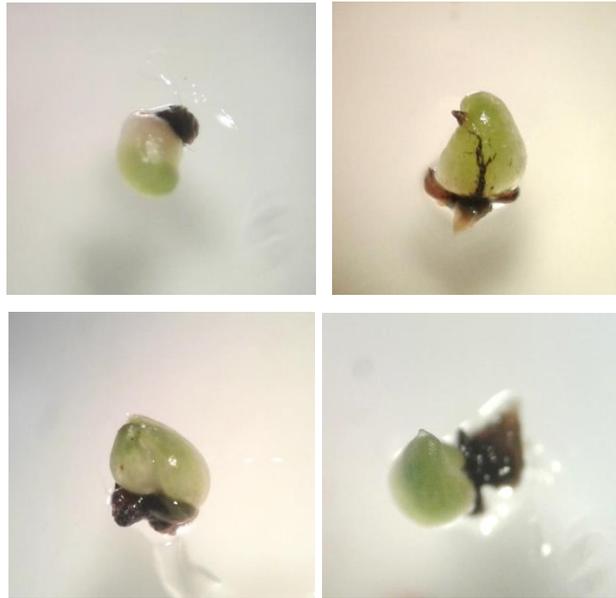


Figura 21. Supervivencia de los micromeristemos.



Figura 22. Regeneración de los micromeristemos.

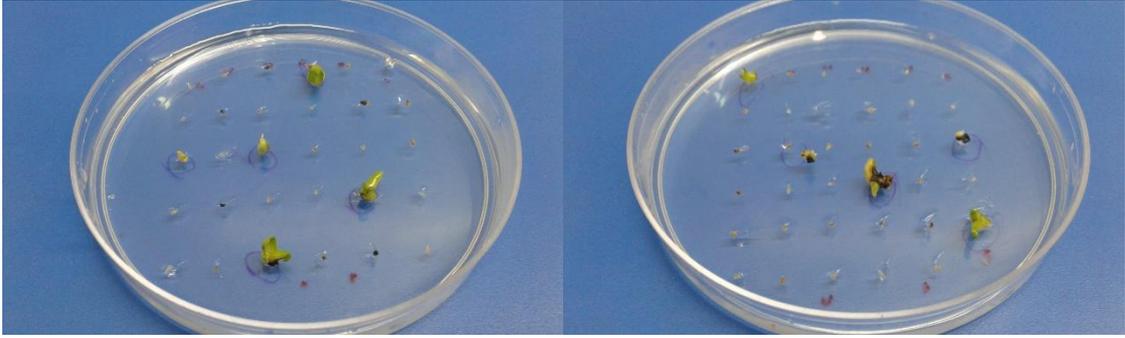


Figura 23. Crecimiento de brotes regenerados.

Apéndice II. Composición de medios y soluciones

Tabla 8. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 (MS).

| <i>Componentes</i> | <i>Unidades</i> |
|---|----------------------|
| Sales minerales | Concentración (mg/L) |
| Cloruro de calcio | 332,02 |
| Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃) | 1 650 |
| Sulfato de magnesio 80.70 | 80,70 |
| Ácido bórico (H ₃ BO ₃) 6.2 | 6,2 |
| Cloruro de cobalto (CoCl ₂ · 6H ₂ O) | 0,025 |
| Sulfato de cobre (CuSO ₄ · 6H ₂ O) | 0,025 |
| Sulfato de manganeso (MnSO ₄ · H ₂ O) | 16,90 |
| Yoduro de potasio (KI) | 0,83 |
| Nitrato de potasio (KNO ₃) | 1 900 |
| Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄) | 170 |
| Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O) | 0,25 |
| Sulfato de zinc (ZnSO ₄ · 7H ₂ O) | 8,60 |
| Fuente de Hierro | |
| Sodio EDTA (Na ₂ · EDTA) | 37,26 |
| Sulfato férrico ((FeSO ₄ · 7H ₂ O) | 27,80 |
| Vitaminas | |
| Mio-inositol | 100 |
| Acido nicotínico | 0,5 |
| Piridoxina HCL | 0,5 |
| Tiamina HCl | 0,5 |
| Glicina (forme libre) | 2,0 |

Medio de propagación

Medio MS (Murashige y Skoog) complementado con sacarosa 30 g/L, 10 µM de BAP, 1 µM de AIA, 2 g/L de Phytigel o 5 g/L de agar.

Medio de Precultivo (PCM)

Medio MS complementado con 0,17 M (60 g/L) sacarosa.

Medio de pretratamiento LS1

Medio MS líquido complementado 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 por un filtro de 0,22 μ .

Solución PVS2

Medio MS diluido en agua complementada con (30 %) 3,26 M de glicerol, (15 %) 2,42 M de EG, (15 %) 1,9 M de DMSO y 0,4 M de sacarosa. La solución es esterilizada por un filtro de 0,22 μ .

Solución RS

Medio MS diluido en agua complementada con 1.2 M (410,4 g/L) de sacarosa ajustado a un pH de 5,8.

Medio de recuperación (Panis, 2009)

Medio MS más la adición de 120 g de sacarosa.

Medio de recuperación (Korneva, 2009)

Medio MS reducido sus componentes a la mitad más la adición de 30 g de sacarosa.

Medio de regeneración (Panis, 2009)

Medio MS con una concentración de BAP de 1 μ M/L.

Medio de regeneración (Korneva, 2009)

Medio MS más la adición de 100 mL de agua de coco.

Apéndice III. Materiales y equipo requerido

Herramientas (Bisturís y cuchillas)

Platillos

Pipetas Pasteur

Fuente de nitrógeno líquido N₂L

Criotanques - 1 para el almacenamiento del nitrógeno líquido
 - 1 para el almacenamiento del material experimental

Cajas de poliestireno

Recipientes de Dewar

Crioviales esterilizados de 2 mL y portador de crioviales

Reactivos (DMSO, EG, etc.)

Microscopio estéreo binocular

Equipo de seguridad: guantes, lentes (para la manipulación del nitrógeno líquido)

Termómetro

Temporizador

Hielera

Apéndice IV. Evaluación estadística

Medidas

| Metodología | Cultivar | Variable | Media | D.E. | E.E. | CV |
|----------------|-------------|--------------------|-------|------|------|-------|
| Metodología I | Barraganete | Sobrevivencia | 1,25 | 0,50 | 0,25 | 40,00 |
| Metodología I | Barraganete | Regeneración | 1,75 | 0,50 | 0,25 | 28,57 |
| Metodología I | Barraganete | Sobrevivencia Tasa | 0,09 | 0,03 | 0,02 | 35,29 |
| Metodología I | Barraganete | Regeneración Tasa | 0,12 | 0,03 | 0,02 | 26,09 |
| Metodología I | Valery | Sobrevivencia | 1,75 | 0,96 | 0,48 | 54,71 |
| Metodología I | Valery | Regeneración | 2,00 | 0,82 | 0,41 | 40,82 |
| Metodología I | Valery | Sobrevivencia Tasa | 0,12 | 0,06 | 0,03 | 52,64 |
| Metodología I | Valery | Regeneración Tasa | 0,13 | 0,05 | 0,03 | 40,11 |
| Metodología I | Williams | Sobrevivencia | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Metodología I | Williams | Regeneración | 2,75 | 0,96 | 0,48 | 34,82 |
| Metodología I | Williams | Sobrevivencia Tasa | 0,07 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Metodología I | Williams | Regeneración Tasa | 0,18 | 0,07 | 0,03 | 36,72 |
| Metodología II | Barraganete | Sobrevivencia | 0,75 | 0,50 | 0,25 | 66,67 |
| Metodología II | Barraganete | Regeneración | 1,00 | 0,82 | 0,41 | 81,65 |
| Metodología II | Barraganete | Sobrevivencia Tasa | 0,05 | 0,04 | 0,02 | 66,67 |
| Metodología II | Barraganete | Regeneración Tasa | 0,09 | 0,03 | 0,02 | 38,49 |
| Metodología II | Valery | Sobrevivencia | 2,25 | 0,50 | 0,25 | 22,22 |
| Metodología II | Valery | Regeneración | 2,75 | 0,96 | 0,48 | 34,82 |
| Metodología II | Valery | Sobrevivencia Tasa | 0,15 | 0,04 | 0,02 | 23,73 |
| Metodología II | Valery | Regeneración Tasa | 0,18 | 0,07 | 0,03 | 36,72 |
| Metodología II | Williams | Sobrevivencia | 2,75 | 1,26 | 0,63 | 45,76 |
| Metodología II | Williams | Regeneración | 4,25 | 1,26 | 0,63 | 29,61 |
| Metodología II | Williams | Sobrevivencia Tasa | 0,19 | 0,08 | 0,04 | 45,12 |
| Metodología II | Williams | Regeneración Tasa | 0,29 | 0,08 | 0,04 | 29,29 |

Análisis de la varianza

Sobrevivencia

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Sobrevivencia | 24 | 0,55 | 0,42 | 45,29 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|----------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 11,88 | 5 | 2,38 | 4,38 | 0,0087 |
| Metodología | 2,04 | 1 | 2,04 | 3,77 | 0,0680 |
| Cultivar | 4,75 | 2 | 2,38 | 4,38 | 0,0281 |
| Metodología*Cultivar | 5,08 | 2 | 2,54 | 4,69 | 0,0229 |
| Error | 9,75 | 18 | 0,54 | | |
| Total | 21,63 | 23 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,63125

Error: 0,5417 gl: 18

| Metodología | Medias | n | E.E. | |
|----------------|--------|----|------|---|
| Metodología I | 1,33 | 12 | 0,21 | A |
| Metodología II | 1,92 | 12 | 0,21 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,93917

Error: 0,5417 gl: 18

| Cultivar | Media | n | E.E. | | |
|-------------|-------|---|------|---|---|
| Barraganete | 1,00 | 8 | 0,26 | A | |
| Williams | 1,88 | 8 | 0,26 | A | B |
| Valery | 2,00 | 8 | 0,26 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,65390

Error: 0,5417 gl: 18

| Metodología | Cultivar | Medias | n | E.E. | | |
|----------------|-------------|--------|---|------|---|---|
| Metodología II | Barraganete | 0,75 | 4 | 0,37 | A | |
| Metodología I | Williams | 1,00 | 4 | 0,37 | A | |
| Metodología I | Barraganete | 1,25 | 4 | 0,37 | A | B |
| Metodología I | Valery | 1,75 | 4 | 0,37 | A | B |
| Metodología II | Valery | 2,25 | 4 | 0,37 | A | B |
| Metodología II | Williams | 2,75 | 4 | 0,37 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Regeneración

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Regeneración | 24 | 0,62 | 0,52 | 37,77 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|----------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo. | 24,83 | 5 | 4,97 | 5,96 | 0,0020 |
| Metodología | 1,50 | 1 | 1,50 | 1,80 | 0,1964 |
| Cultivar | 18,08 | 2 | 9,04 | 10,85 | 0,0008 |
| Metodología*Cultivar | 5,25 | 2 | 2,63 | 3,15 | 0,0671 |
| Error | 15,00 | 18 | 0,83 | | |
| Total | 39,83 | 23 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,78297

Error: 0,8333 gl: 18

| Metodología | Medias | n | E.E. | |
|----------------|--------|----|------|---|
| Metodología I | 2,17 | 12 | 0,26 | A |
| Metodología II | 2,67 | 12 | 0,26 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,16490

Error: 0,8333 gl: 18

| Cultivar | Media | n | E.E. | | |
|-------------|-------|---|------|---|---|
| Barraganete | 1,38 | 8 | 0,32 | A | |
| Valery | 2,38 | 8 | 0,32 | A | B |
| Williams | 3,50 | 8 | 0,32 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,05141

Error: 0,8333 gl: 18

| Metodología | Cultivar | Medias | n | E.E. | | |
|----------------|-------------|--------|---|------|---|---|
| Metodología II | Barraganete | 1,00 | 4 | 0,46 | A | |
| Metodología I | Barraganete | 1,75 | 4 | 0,46 | A | |
| Metodología I | Valery | 2,00 | 4 | 0,46 | A | |
| Metodología I | Williams | 2,75 | 4 | 0,46 | A | B |
| Metodología II | Valery | 2,75 | 4 | 0,46 | A | B |
| Metodología II | Williams | 4,25 | 4 | 0,46 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Sobrevivencia Tasa

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Sobrevivencia Tasa | 24 | 0,54 | 0,42 | 44,30 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|----------------------|------|----|---------|------|---------|
| Modelo. | 0,05 | 5 | 0,01 | 4,28 | 0,0097 |
| Metodología | 0,01 | 1 | 0,01 | 3,58 | 0,0747 |
| Cultivar | 0,02 | 2 | 0,01 | 4,27 | 0,0305 |
| Metodología*Cultivar | 0,02 | 2 | 0,01 | 4,65 | 0,0235 |
| Error | 0,04 | 18 | 2,4E-03 | | |
| Total | 0,09 | 23 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04164

Error: 0,0024 gl: 18

| Metodología | Medias | n | E.E. | |
|----------------|--------|----|------|---|
| Metodología I | 0,09 | 12 | 0,01 | A |
| Metodología II | 0,13 | 12 | 0,01 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06195

Error: 0,0024 gl: 18

| Cultivar | Medias | n | E.E. | | |
|-------------|--------|---|------|---|---|
| Barraganete | 0,07 | 8 | 0,02 | A | |
| Williams | 0,13 | 8 | 0,02 | A | B |
| Valery | 0,13 | 8 | 0,02 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10910

Error: 0,0024 gl: 18

| Metodología | Cultivar | Medias | n | E.E. | | |
|----------------|-------------|--------|---|------|---|---|
| Metodología II | Barraganete | 0,05 | 4 | 0,02 | A | |
| Metodología I | Williams | 0,07 | 4 | 0,02 | A | |
| Metodología I | Barraganete | 0,09 | 4 | 0,02 | A | B |
| Metodología I | Valery | 0,12 | 4 | 0,02 | A | B |
| Metodología II | Valery | 0,15 | 4 | 0,02 | A | B |
| Metodología II | Williams | 0,19 | 4 | 0,02 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Regeneración Tasa

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|-------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Regeneración Tasa | 23 | 0,60 | 0,48 | 35,82 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|----------------------|------|----|---------|------|---------|
| Modelo. | 0,09 | 5 | 0,02 | 5,04 | 0,0052 |
| Metodología | 0,01 | 1 | 0,01 | 2,84 | 0,1101 |
| Cultivar | 0,06 | 2 | 0,03 | 8,98 | 0,0022 |
| Metodología*Cultivar | 0,02 | 2 | 0,01 | 2,08 | 0,1551 |
| Error | 0,06 | 17 | 3,6E-03 | | |
| Total | 0,15 | 22 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05294

Error: 0,0036 gl: 17

| Metodología | Medias | n | E.E. | |
|----------------|--------|----|------|---|
| Metodología I | 0,14 | 12 | 0,02 | A |
| Metodología II | 0,19 | 11 | 0,02 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07892

Error: 0,0036 gl: 17

| Cultivar | Media | n | E.E. | | |
|-------------|-------|---|------|---|---|
| Barraganete | 0,10 | 7 | 0,02 | A | |
| Valery | 0,16 | 8 | 0,02 | A | B |
| Williams | 0,23 | 8 | 0,02 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13968

Error: 0,0036 gl: 17

| Metodología | Cultivar | Medias | n | E.E. | | |
|----------------|-------------|--------|---|------|---|---|
| Metodología II | Barraganete | 0,09 | 3 | 0,03 | A | |
| Metodología I | Barraganete | 0,12 | 4 | 0,03 | A | |
| Metodología I | Valery | 0,13 | 4 | 0,03 | A | |
| Metodología II | Valery | 0,18 | 4 | 0,03 | A | B |
| Metodología I | Williams | 0,18 | 4 | 0,03 | A | B |
| Metodología II | Williams | 0,29 | 4 | 0,03 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).