

## EVALUACIÓN FENOTÍPICA Y BIOQUÍMICA DE PLANTAS REGENERADAS DE MERISTEMOS PROLIFERANTES CRIOCONSERVADOS DE PLÁTANO (*MUSA SPP.*)

María de los Ángeles Torres<sup>1</sup>, María I. Román<sup>2</sup>, Clara González<sup>3</sup>,  
Arlene Rodríguez Manzano<sup>1</sup>, Zoila Fundora Mayor<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), Calle 2, esq. 1 Santiago de las Vegas, Boyeros, La Habana, Cuba CP

[17200.matorres@inifat.co.cu](mailto:17200.matorres@inifat.co.cu)

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 16, Barrio del Río, Santo Domingo, Villa Clara.

<sup>3</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 No 455 entre I y J, Vedado, CP 10400, Ciudad de La Habana.

### RESUMEN

El plátano ‘Burro Criollo’ (*Musa spp.*), un cultivar tradicional de consumo en la región oriental del país, susceptible al Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). La crioconservación se llevó a cabo mediante un protocolo denominado método simple, basado en un precultivo de los agregados de meristemos en medio enriquecido con 0.4-0.5 M de sacarosa, durante tres semanas, seguido de enfriamiento rápido. Los cultivos de meristemos proliferantes se obtienen por subcultivos en 6-bencil-amino-purina (BAP). La utilización de estas estructuras biológicas, de alta proliferación, puede originar interrogantes acerca de la estabilidad de las plantas regeneradas. Los meristemos proliferantes crioconservados regeneraron brotes, que se desarrollaron en plantas de campo. Sus caracteres morfológicos y del rendimiento se compararon mediante una prueba de t de Student, con plantas similares, de origen idéntico al de las plantas donantes de los explantes. Se determinaron además, los patrones isoenzimáticos para los sistemas peroxidasas, polifenoloxidasas y estererasas. No se encontraron diferencias significativas en los caracteres morfológicos ni del rendimiento, atribuibles al protocolo utilizado. Tampoco se observaron variaciones en los patrones de las bandas para ambas variantes. Los resultados indicaron que las estructuras de agregados de meristemos no originaron variaciones genéticas significativas.

**Palabras claves:** plátano, crioconservación, evaluación fenotípica.

### PHENOTYPICAL AND BIOCHEMICAL EVALUATION OF COOKING BANANA PLANTS (*MUSA SPP.*) REGENERATED OF PROLIFERATING MERISTEMES

#### ABSTRACT

‘Burro Criollo’ (*Musa spp.*) is a cooking banana, which is a traditional cultivar from the east of Cuba, susceptible to Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Cryopreservation protocol, defined as simple method, consist in a pregrowth of proliferating meristems (cauliflower like structures) in MS medium with 0.4-0.5 M sucrose, during three weeks, followed by a rapid freezing. Proliferating meristem cultures were obtained by subcultures in 6-bencyl-amino-purine (BAP). These proliferating structures can originate doubts about the stability of regenerated plants. Shoots regenerated of cryopreserved proliferating meristems developed field plants. Morphological and yield characters of these plants were compared, by a t Student test, with characters of similar plants of identical origin from explants donors plants. Also, the isoenzymatic patterns of peroxidases, polyphenoloxidasases and esterases were evaluated. It was not found significant differences in morphological and yield characters of the plants which could be related

with the cryopreservation procedure, neither variation of the isoenzymatic patterns. These results pointed out proliferating meristems did not originate significant genetic variations.

**Key words:** Cooking banana, cryopreservation, phenotypical evaluation.

## INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos constituyen el segundo cultivo agrícola de mayor producción en el mundo, cultivado en las regiones tropicales y subtropicales, fundamentalmente en los países en desarrollo. En la actualidad, crecen en cerca de 150 países, cubriendo un área de 4.84 millones de hectáreas y su producción alcanzó en 2009 la cifra de 95.6 millones de toneladas (Singh *et al.*, 2011).

Después del establecimiento en Cuba de los patógenos severos para el plátano y el banano, algunos clones han quedado reducidos a pequeñas plantaciones; entre ellos el cv. 'Burro Criollo', cultivado tradicionalmente en la región oriental del país, susceptible al Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, raza 2). Este cultivar, que posee excelente calidad para el consumo en la cocina tradicional, ocupó un lugar importante en la alimentación de las zonas rurales. Sus atributos le atribuyen a su germoplasma valor potencial, a partir del desarrollo de técnicas para la obtención de variantes somaclonales (Pedraza *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011). La conservación *in vitro* del germoplasma del plátano y el banano en medio de cultivo a la temperatura de 15°C, es aplicable a un amplio rango de genotipos (Van der Houwe *et al.*, 1995). En cuanto a la crioconservación, Panis (1995, 2009) desarrolló un protocolo tomando como estructura meristemos proliferantes. El protocolo es sencillo y económico y ha tenido buenos resultados para los clones del grupo ABB (Panis, 2000).

Sin embargo, el hecho de que se tomen meristemos obtenidos por subcultivos con relativamente altas concentraciones de BAP como estructura para la crioconservación, origina una interrogante en cuanto al efecto que este procedimiento pudiera tener sobre la estabilidad genética de las plantas regeneradas después del tratamiento. Resulta evidente que la utilidad de un método de conservación está muy vinculado a la posibilidad que éste brinda para lograr la mayor estabilidad posible de los genotipos. Este trabajo resume los resultados obtenidos de la crioconservación de agregados de meristemos del cv. 'Burro Criollo', así como la evaluación fenotípica en campo de las plantas regeneradas, incluyendo ensayos isoenzimáticos de los regenerantes

## MATERIALES Y MÉTODOS

La preparación de los meristemos y el protocolo para la crioconservación (método simple) se realizaron mediante los procedimientos descritos por Panis en 1995 y 2009.

**Material vegetal.** Se trabajó con estructuras de meristemos proliferantes tipo coliflor del clon 'Burro Criollo' (Grupo ABB, subgrupo Bluggoe), obtenidos por subcultivos en medio de propagación de plátano, con 44.5 µM de 6-bencil-amino-purina (BAP) (Vuyksteke, 1989).

**Método de crioconservación.** Se aplicó el método descrito, consistente en cortar los agregados de meristemos en fragmentos de 3-4 ápices y precultivarlos en medio Mureshige y Skoog (1962) (MS) sólido con niveles de 0.4M y 0.5 M de sacarosa por tres semanas. Después del precultivo, se seleccionaron los fragmentos que conservaban el color blanco brillante, se colocaron en crioviales de 1.8 ml y se sumergieron en nitrógeno líquido por una hora. A continuación, los crioviales se pasaron a un baño de agua a 40°C, por un intervalo de uno a dos minutos, hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los agregados se transfirieron al medio de regeneración. En este trabajo se realizó un primer experimento en el que se probaron las concentraciones de sacarosa entre 0.2 M y 0.6 M, con tiempos de precultivo entre una y cuatro

semanas, con un tamaño de muestra de tres réplicas de 10 explantes por variante. Posteriormente, se realizó un tratamiento de crioconservación con el precultivo en 0.5 M de sacarosa por tres semanas, con un tamaño de muestra de seis réplicas de 10 explantes para la variante tratada con nitrógeno líquido y la testigo.

**Regeneración de plantas.** Los ápices emergentes después de la crioconservación regeneraron vitroplantas que, una vez que alcanzaron los 10 cm de altura, se transfirieron a potes con una mezcla esterilizada de suelo, arena y materia orgánica en la proporción 1:1:1, para su aclimatización. Posteriormente, las plantas se transfirieron a bolsas de polietileno con la misma composición del sustrato. Cuando las plantas alcanzaron la talla aproximada de 30 cm, y de tres a cinco hojas, se realizó la revisión de sus características (100 plantas) y 50 de ellas se plantaron en las áreas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), sobre suelo Ferralítico Rojo. En la misma área, junto a las plantas regeneradas del procedimiento de crioconservación, se sembraron hijuelos de tamaño similar (aproximadamente 30 cm de altura), obtenidos de los mismos plantones que las plantas donantes de los explantes. Todas las plantas recibieron las mismas atenciones culturales establecidas para el cultivo.

**Caracterización agromorfológica.** Los caracteres cualitativos de las plantas, la inflorescencia, el fruto y la susceptibilidad a enfermedades, se evaluaron según los descriptores definidos por IPGRI-INIBAP/CIRAD (1996). Estos fueron: el ahijamiento, la coloración del pseudotallo y el follaje, los márgenes del peciolo, la cera en el pseudotallo y el follaje, el ángulo del raquis de la inflorescencia masculina, el número de manos, la inserción de las brácteas en el raquis masculino, el comportamiento, la forma y el ápice de yema masculina, el color interior de la bráctea masculina, el color de la flor masculina, la inserción de la base del fruto, el ápice del fruto, la forma de la sección transversal del fruto, el color de la pulpa y la susceptibilidad a enfermedades.

Como caracteres cuantitativos se evaluaron: la altura de la planta, como la distancia de la base al punto de divergencia de las 2 últimas hojas (m); circunferencia del pseudotallo (cm) (medida a la distancia de 1 un metro de la base); longitud del peciolo: distancia entre la base del limbo y el punto en que la vaina foliar diverge de la que le precede (cm); número de hojas; forma de la hoja dada por la relación largo/ancho; peso del racimo (kg); número de manos; peso de la segunda mano (kg); número de frutos por mano; perímetro del fruto central de la segunda mano (cm), forma del fruto (l/a) (Sandoval, 1994).

Las medias obtenidas de la evaluación de los caracteres cuantitativos se compararon mediante una prueba de t de Student. Debido a la alta susceptibilidad del cultivar al Mal de Panamá, algunas plantas no pudieron ser evaluadas en la fase de llenado de los frutos. Por ello, el número de réplicas varió, en dependencia de la fase del desarrollo a la que corresponden, entre 30 y 35 plantas.

**Evaluación isoenzimática.** Se tomaron muestras de vástagos en estadio del desarrollo ontogénico de cigarro, por cada plantón. Los extractos se obtuvieron a partir de 5g de hojas maceradas con buffer de extracción fosfato 0.1 M, pH 7.0. Las corridas de electroforesis se realizaron en sobre gel de poliacrilamida (PAGE) y un sistema de buffer discontinuos (Orstein, 1964; Davis, 1964), con buffer de corrida Tris glicina 0.04 M, pH 8.3 para las isoenzimas peroxidasas, polifenoloxidasas y estererasas. La concentración del gel de separación y la tinción de cada tipo de isoenzima se realizó como se resume a continuación:

Patrón isoenzimático	Concentración del gel de separación (%)	Método de tinción
Peroxidasas	8.5	Iglesias <i>et al.</i> , 1974
Estererasas	10.0	González y González, 1981
Polifenoloxidasas	8.5	Guedez y Rodríguez, 1974

En cada corrida se analizaron 10 plantas obtenidas de material crioconservado y 2 de hijuelos de campo, cada una con dos réplicas.

**RESULTADOS**

Los resultados de las variantes de precultivo dadas por las concentraciones de sacarosa entre 0.2 M y 0.6 M y las variantes de tiempo entre una y cuatro semanas, se presentan en la Tabla 1. En las condiciones experimentales de este trabajo, la variante del precultivo con 0.5 M de sacarosa durante tres semanas permitió la mayor supervivencia a la crioconservación

**Tabla1. Efecto del precultivo en sacarosa sobre la supervivencia de los agregados de meristemos del clon ‘Burro Criollo’ (ABB) a la crioconservación. Los valores se expresan en %.**

Tiempo (semanas)	Tratamientos	Concentración de sacarosa (M)				
		0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
1	T	-	-	-	80	43 *
	NL	-	-	-	0	43 *
2	T	100	78	50	48	-
	NL	0	0	0	4	-
3	T	100	70	75	46	-
	NL	0	0	4	34	-
4	T	100	24	32	10	-
	NL	0	0	10	0	-

T- Testigo, sin nitrógeno líquido  
 NL- Tratado con nitrógeno líquido  
 \* No se obtuvo regeneración de ápices.  
 - significa no se realizó la evaluación

En el segundo experimento con mayor número de réplicas, las muestras precultivadas a la concentración de 0.5 M de sacarosa durante tres semanas, tuvieron una alta viabilidad en la fase de recuperación, posterior al tratamiento. La muestra testigo mostró un 100% de supervivencia y la tratada con nitrógeno líquido alcanzó el 65.5%, lo cual guarda relación con los resultados reportados por Panis para otros clones del grupo ABB (Panis, 2009). Así mismo, se observó una alta tasa de regeneración de brotes, que derivaron en vitroplantas (Figura 1).



Figura 1. Brotes regenerando a partir de meristemos proliferantes tratados con nitrógeno líquido. Clon “Burro Criollo” (ABB).

Las investigaciones realizadas sobre el efecto del precultivo en sacarosa sobre la protección del explante, citadas por Panis (2009), indican el precultivo en sacarosa resulta en una disminución lenta del contenido de humedad debido a su efecto osmótico, disminuyendo el punto de congelación y la cantidad de agua congelable. Además, los azúcares también pueden mantener

el estado de las membranas y estabilizar las proteínas. Se ha determinado que, en el banano, el precultivo en sacarosa produce variaciones en las proteínas (Carpentier *et al.* 2005, 2007), los componentes de la membrana, los azúcares y las poliaminas (Zhu *et al.* 2006).

Durante las fases de desarrollo de las plántulas *in vitro* y la aclimatización en bolsas de polietileno, no se encontró variación en la altura o la morfología, que pudiera indicar la aparición de variaciones. Existen reportes de que las variaciones en la altura de la planta (enanismo o gigantismo) y en el color de las hojas (características de mosaico o variegadas) se manifiestan desde la fase de aclimatización (Sandoval, 1994); en el caso de la micropropagación comercial se ha recomendado la detección visual para evitar el establecimiento de variantes en el campo.

La evaluación de los caracteres morfológicos cualitativos de las plantas de campo no aportó ninguna diferencia entre las plantas provenientes de los meristemos proliferantes crioconservados y las desarrolladas a partir de los hijuelos de los plantones originales. No se observó ningún individuo fuera de tipo. Los caracteres de la planta, la inflorescencia y el fruto propios del clon, se presentan en la Tabla 2. En cuanto a las características de la planta, se observa que el cultivar presenta un ahijamiento denso, propio del subgrupo ABB. Este cultivar presenta alta proliferación *in vitro*, por lo cual puede producir agregados de meristemos proliferantes espontáneamente, y sólo requiere de 2-3 subcultivos en 44.5 µM de 6-bencil-amino-purina para la formación de estos agregados (Torres *et al.*, 2000). La Figura 2 muestra las características del racimo y los frutos.

Un aspecto de interés fue la alta susceptibilidad que presentó el clon al ataque del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Todas las plantas, originadas igualmente de meristemos crioconservados o de hijuelos de campo, presentaron los síntomas. La enfermedad se manifestó antes de completar el crecimiento y la emergencia de la inflorescencia. Por esta causa no fue posible evaluar un segundo ciclo de cultivo en el campo, aspecto de interés para conocer la estabilidad de la descendencia.

**Tabla 2. Caracteres morfológicos cualitativos de la planta, la inflorescencia y el fruto del clon 'Burro Criollo' (ABB).**

Caracteres de la planta		Caracteres de la inflorescencia		Caracteres del fruto	
Ploidía	Triploide (ABB)	ARI	Penduloso	IBF	Pedicelo largo
Ahijamiento	Denso	NM	Pocas	AF	Algo constricto
CPPF	Ligera	IB	Prominente	FST	Fuertemente angular
MP	Abierto	CBM	Revoluta	CP	Crema
CPF	Ninguna	ABM	Agudo		
SE ( <i>Fusarium</i> )	Alta	CIBM	Púrpura		
		CFM	Rosa pálido		

**Leyenda.**

CPPF- Coloración púrpura del pseudotallo y follaje; MP- Márgenes del peciolo; CPF- Cera en el pseudotallo y follaje; SE *Fusarium*- Susceptibilidad a enfermedades, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; ARI- Angulo del raquis de la inflorescencia; NM- Número de manos; IB- Inserción de las brácteas; CBM- Comportamiento de la bráctea masculina; FBM- Forma de la bráctea masculina; ABM- Ápice de la bráctea masculina; CIBM- Color interior de la bráctea masculina; CFM- Color de la flor masculina; IBF- Inserción de la base del fruto; AF- Ápice del fruto; FST- Forma de la sección transversal; CP- Color de la pulpa.



Figura 2. Racimo y frutos del clon “Burro Criollo” (ABB), obtenidos de plantas regeneradas de meristemos proliferantes tratados con nitrógeno líquido.

La Tabla 3 recoge las características morfológicas cuantitativas. Como puede observarse, el único carácter que mostró diferencias en cuanto al origen fue el número de hojas (limbos), que resultó mayor en el momento del corte del racimo, para las plantas obtenidas de material crioconservado. Esta característica pudo deberse a un mayor vigor inicial de las plantas, que al pasar por el cultivo de tejidos, se liberan de nemátodos y otras plagas que pueden afectar a las plantas propagadas por plantones.

Así en la actualidad se conoce que la crioconservación tiene un efecto en la erradicación de patógenos, conocido como crioterapia. Wang y Valkonen (2009) señalan la crioterapia como una nueva técnica para la erradicación de patógenos, la cual facilita el tratamiento de un número grande de muestras y que es independiente del tamaño del ápice, por lo que tiene potencialidad para sustituir el método tradicional de cultivo de meristemos. Los autores la han aplicado con éxito para la erradicación de patógenos en la frambuesa (Wang y Valkonen; 2008, 2009). Helliot *et al.* 2002 reportó también la crioterapia para la erradicación de virus en plantas de banano cv. ‘Williams’ (AAA, subgrupo Cavendish).

**Tabla 3. Caracteres morfológicos cuantitativos de las plantas originadas de los agregados de meristemos tratados con nitrógeno líquido y de las plantas de campo de origen.**

Carácter	PAM-NL	PO	t	Significación
Altura (m)	3.02	3.17	-2.01	ns
Circunferencia del pseudotallo (cm)	45.4	43.1	1.72	ns
Número de limbos	9.4	6.0	3.97	**
Longitud del peciolo (cm)	62.4	51.1	1.96	ns
Forma de la hoja (l/a)	2.9	2.8	1.05	ns

**Leyenda:** PAM-NL: Plantas regeneradas a partir de agregados de meristemos tratados con nitrógeno líquido; PO: Plantas de campo desarrolladas a partir de hijuelos de las plantas de campo originales; (n= 35).

La Tabla 4 contiene las características de la evaluación de los caracteres cuantitativos del racimo y los frutos. En la misma, se aprecia que las diferencias están asociadas a una mayor ganancia en peso de los frutos originados de material crioconservado, la cual puede estar relacionada con el mayor número de hojas observado y con ello, a una mayor capacidad fotosintética de la planta. Drew y Smith (1990) también reportaron la ganancia en peso del racimo de las plantas producidas *in vitro*, respecto a las desarrolladas de cormos en el cultivar 'New Guinea-Cavendish' (AAA-subgrupo Cavendish). Los autores también observaron un aumento de la talla de la planta, lo cual no se produjo en el caso de las plantas de 'Burro Criollo' producidas a partir de los meristemos proliferantes crioconservados.

**Tabla 4. Características del racimo y los frutos de las plantas originadas de los agregados de meristemos tratados con nitrógeno líquido y de las plantas de campo de origen.**

Carácter	PAM-NL	PO	t	Significación
Peso del racimo (kg)	11.1	8.9	3.0	**
Número de manos	5.3	4.8	1.7	ns
Peso de la segunda mano (kg)	2.1	1.6	2.65	**
Número de frutos por manos	11.6	11.5	0.15	ns
Forma del fruto (l/a)	3.3	3.8	-2.2	*
Perímetro del fruto central de la segunda mano (cm)	15.1	14.4	1.9	ns

**Leyenda:** PAM-NL: Plantas regeneradas a partir de agregados de meristemos tratados con nitrógeno líquido; PO: Plantas de campo desarrolladas a partir de hijuelos de las plantas de campo originales; (n= 30).

Existen otros trabajos que expresan que la variación producto de la micropropagación, en su mayoría reproducen las variaciones que ocurren de modo natural (Sandoval *et al.*, 1997). También se considera que los ápices y meristemos producen variaciones somaclonales con menor frecuencia que otros cultivos, como los callos o suspensiones celulares (Panis, 2009; Tingh *et al.*, 2011). Por otra parte, la frecuencia de las variaciones somaclonales se asocian con los genotipos y otros factores ambientales, como los reguladores del crecimiento y la duración de los cultivos (Tingh *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Côte *et al.*, (1993), sobre las variaciones inducidas por el cultivo de tejidos sobre los bananos y los plátanos, los autores recopilan 24 trabajos, en los cuales aparecen 12 citas de variación en el cv. 'Gran Enano' (AAA), y reportes referidos a otros seis cultivares del grupo AAA y a 14 del AAB. Sólo se recoge una variante del grupo ABB. De estos elementos se puede inferir que los cultivares con mayor composición *acuminata* tienen mayor tendencia a la variación. Al mismo tiempo, esos cultivares son de mayor importancia comercial, por lo que la alta frecuencia de variaciones se ha observado en la micropropagación a gran escala.

En relación con la estabilidad de las plantas regeneradas de la crioconservación, Côte *et al.*, (2000) reportaron la evaluación en campo de plantas de banano (*Musa AA sp.*), obtenidas de suspensiones celulares crioconservadas. Los autores sólo señalan ligeras diferencias entre las plantas regeneradas de las suspensiones celulares y el control, dadas por una disminución del número de manos de 8.7 a 8.5 como promedio y una extensión en tres días, del período requerido para la floración durante el primer ciclo en el campo. Estas diferencias se eliminan durante el segundo ciclo; los autores sugieren que pueden deberse a otras causas diferentes de la crioconservación, ya que las plantas control estuvieron en las condiciones de cultivo *in vitro* por un período que excedió en un mes al de las suspensiones crioconservadas; por lo cual, las diferencias podrían deberse a las condiciones del material vegetal durante la fase de aclimatización.

La Figura 3a representa el zimograma para las isoenzimas peroxidadas, la que presenta tres bandas para todo el material estudiado, con predominio del patrón *balbisiana*, Estos resultados coinciden con el trabajo realizado por Iglesias (1980), Román y Manzano (1991) y Martínez *et al.* (1998) para el cultivo. El zimograma para las enzimas polifenoloxidasas (Figura 3b) presenta cuatro bandas con un marcado monomorfismo y guarda relación con el descrito por Rodríguez *et al.* (1991) para los somaclones 'Burro CEMSA 1' y 'Burro CEMSA 2'. Esto es coherente con la derivación del 'Burro CEMSA' del clon 'Burro Criollo', por lo que puede tomarse este zimograma como identificativo de la aportación del clon 'Burro Criollo' al genotipo de cualquier clon mejorado que lo tenga como progenitor. Dentro del sistema isoenzimático esterasas (Figura 3c) se observaron un total de seis bandas. Los resultados obtenidos en este estudio muestran homogeneidad del material. No se encontró en ningún caso diferencias entre el patrón de bandas de las plantas originadas de los 10 plantones (considerados en el análisis) procedentes de meristemos proliferantes crioconservados y los dos plantones procedentes de los plantones originales, tomados como testigo. Aunque se considera que el análisis de isoenzimas aporta información sobre una parte relativamente pequeña del genoma, el resultado constituye un elemento más a favor del criterio de que no se produjo una alta variabilidad como consecuencia de la formación de los agregados de meristemos, así como tampoco en la fase de regeneración de éstos después de la crioconservación. Existen otros trabajos en los que se evalúan la estabilidad genética después de la crioconservación mediante marcadores moleculares, en los que tampoco se han encontrado variaciones. Así, Li *et al.* (2010) no encontraron variaciones al evaluar las plántulas regeneradas de la crioconservación de ápices de banano, utilizando los marcadores de microsatélites (SSR).

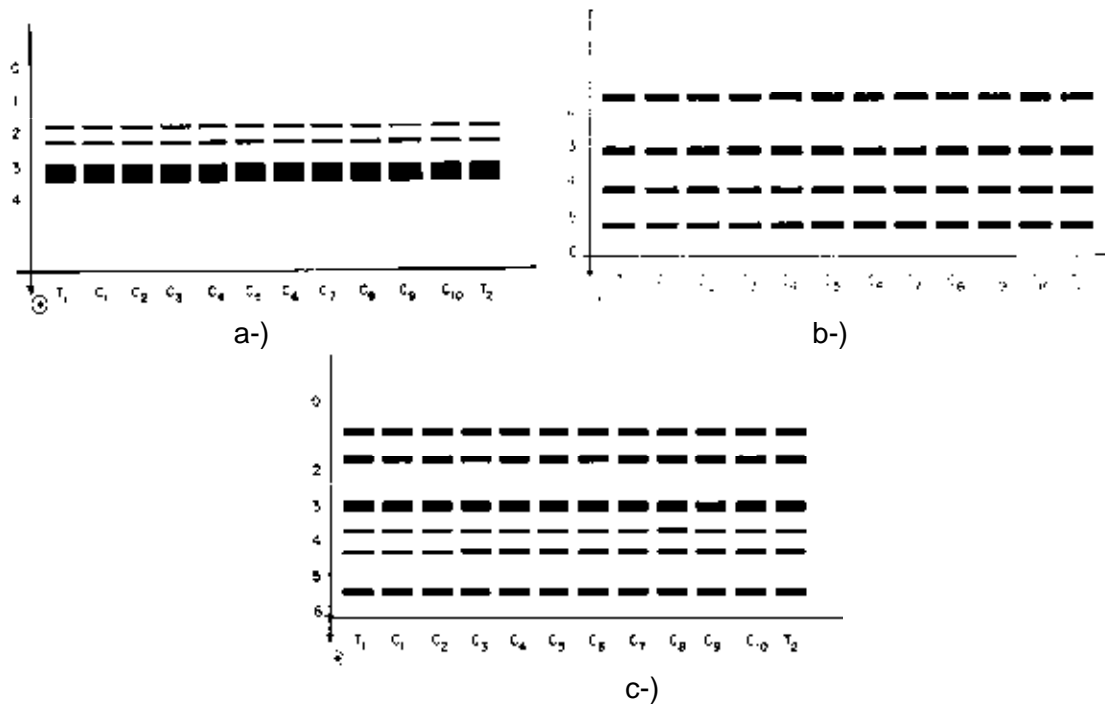


Figura 3. Zimogramas del clon 'Burro Criollo' (ABB). a-): Peroxidasas; b-): Esterasas; c-): Polifenoloxidasas C1, C2... C10: Plantas regeneradas de meristemoscrioconservados. T1, T2: Plantas desarrolladas a partir de hijuelos de las plantas de campo originales.

En la actualidad se ha profundizado en el conocimiento en la estructura del complejo de especies del genero *Musa* mediante los descriptores morfológicos y las técnicas de marcadores moleculares del genoma nuclear, cloroplástico y mitocondrial, lo cual constituye un medio

valioso para futuros propósitos de evaluación de la estabilidad de las plantas regeneradas de la crioconservación (Biodiversity Internacional, 2006).

Hasta el presente se han desarrollado diferentes protocolos para la crioconservación vegetal, ya que las respuestas a estos protocolos varían notablemente entre especies y aún entre genotipos de una misma especie. Sakai y Engelmann (2007), publicaron un estudio sobre el protocolo denominado vitrificación y dos protocolos derivados: la encapsulación-vitrificación y la gota-vitrificación, los que han sido probados con éxito en diferentes cultivos. Panis (2009) estableció la técnica de gota-vitrificación de meristemos apicales y de meristemos proliferantes, para la conservación de la colección *Musa*, debido a la diferente respuesta entre los grupos genéticos ABB, AAB, AAA, y los denominados bananos de las Alturas del Este de Africa (AAA Highland bananas), que resultaron los de más baja respuesta. Así mismo, Ellis *et al.* (2006) del Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos de los Estados Unidos (USDA-ARS, por sus siglas en inglés), al evaluar la respuesta a la crioconservación de doce genotipos de ajo, encontraron que cinco genotipos fueron crioconservados exitosamente con la solución de vitrificación PVS2, cuatro tuvieron mejor respuesta con la PVS3 y tres tuvieron igual respuesta con ambas soluciones. Esto indica que la conveniencia de utilizar un protocolo u otro, no solo depende de su complejidad y flexibilidad, sino también de los objetivos a los que está dirigida la conservación y de las características del germoplasma que se pretende conservar.

### CONCLUSIONES

El cv. 'Burro Criollo' (ABB), mostró una respuesta satisfactoria a la crioconservación, mediante el método simple, con una regeneración de brotes superior al 50 %, a partir de los cuales se obtuvieron vitroplantas que completaron su ciclo vital en el campo.

Las plantas obtenidas de meristemos proliferantes crioconservados no mostraron variaciones morfológicas en ninguna fase de su desarrollo, desde la vitroplanta a la fase de corte del racimo. No se observó variabilidad en los caracteres del rendimiento ni en los patrones de las isoenzimas peroxidasa, esterasa y polifenoloxidasas, atribuibles al tratamiento.

Estos resultados indican que no se produjo una alta variabilidad en los meristemos proliferantes crioconservados del cv. 'Burro Criollo' (ABB), cuando para su formación, la concentración de BAP no fue superior a los 44.5  $\mu\text{M}$  (10  $\text{mg l}^{-1}$ ).

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Bart Panis, y al Laboratorio de Mejoramiento de Cultivos Tropicales de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica, por la asesoría y la información recibida en relación con la crioconservación de plátano; y al Dr. Florent Engelmann de Biodiversity Internacional, anteriormente International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) por el apoyo ofrecido para la ejecución de este trabajo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Biodiversity Internacional. 2006. *Musa* Genomics: *Musa* Genomics Home. 2011 *Musa* Knowledge Databases. Genetic diversity. Molecular markers. <http://www.musagenomics.org/> : 7 de mayo del 2010.

Carpentier S., E. Witters, K. Laukens, H. Van Onckelen, R. Swennen & B. Panis. 2007. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics* 7:92-105.

Carpentier S., E. Witters, K. Laukens, P. Deckers, R. Swennen & B. Panis. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5:2497-2507.

- Côte, F. X., O.Goue, R. Domergue, B. Panis and C. Jenny. 2000. In-field behavior of banana plant (*Musa* AA sp.) obtainer after regeneration of cryopreserved embriogenic cell suspensions. *Cryo-Letters* 21, 19-24.
- Dave E., D. Skogerboe, C. Andre, B.Hellier and G. Volk. 2006. Implementation of garlic cryopreservation techniques in the national plant germplasm system. *CryoLetters* 27 (2), 99-10.
- Davis, B .J. 1964. Acrilamide gel electrophoresis. *Ann N.Y. Aca. Sci.* 350-361.
- Drew, R. A. and M.K. Smith 1990. Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 30: 569-574.
- González, C. y J. A. González. 1981. Estudio de patrones para la Lima Persa III. Caracterización isoenzimática. *Cienc. Tec. Agric.* 4:2: 102-108.
- Guedez, M.E. and C. I. Rodríguez. 1974. Disc electrophoretic patterns of phenoloxidasas from leaves of coffee cultivars. *Sep. of Portugal. Acta Biológica. Serie A. Vol XIII:102-177.*
- Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P. and Frison, E. 2002. Cryopreservation for the elimination of *cucumber mosaic and banana streak viruses* from banana. *Plant Cell Reports*, 20: 1117-1122.
- Iglesias, L. 1980. Relación entre la constitución genómica e isoenzimática peroxidasa en el género *Musa*. *Cultivos Tropicales*: 2:143-156.
- Iglesias, L., H. Lima and J. P. Simón. 1974. Isosyme identification of nucellar seedling in citrus. *J. Heredit.* 65: 81-84.
- IPGRI-INIBAP/CIRAD. 1996. Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogeneticos, Roma, Italia; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Platano, Montpellier, Francia; y el Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, Montpellier, Francis. 63 p.
- LI Jun-hui<sup>1</sup>; HE Ping; CHEN Xiao-ling; LU Xin-xiong; XIN Xia; ZHANG Zhi-e; XIN Ping-ping 2010. Cryopreservation of *in vitro* Shoot-Tips of Banana (*Musa* spp.). *Journal of Plant Genetic Resources.* [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-ZWYC201001007.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZWYC201001007.htm): 28 octubre 2011.
- Murashige,T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473- 497.
- Ortein, L. 1964. Disc electrophoresis. J. Background and Theory *Ann N. Y. Acad. Sci.* 121:321-349.
- Panis B. 2009. Cryopreservation of *Musa* germplasm: 2nd edition. Technical Guidelines No. 9 (F. Engelmann and E. Benson, eds). Bioersivity International, Montpellier, France. 51 p.
- Panis, 1995. Cryopreservation of banana (*Musa* spp) germplasm. *Disertaciones de Agricultura.* Katolike Universiteit, Leuven, 201p.

- Pedraza, T.R.; H.M.Estrada; L.G.Díaz; D.A.Aragón; O. Triana; A. de la Nuez; E. Reinaldo, E. Hernández; J. Simó and A. Ortega. 2006. Morphological characterization of two somaclonal variants of FIAH-21. *InfoMusa*, Vol. 15. No1-2: 26-27.
- Ramcharan, C., A. González, W. I. Knausenberger. 1985. Performance of plantain produced from tissue culture plantlets in St. Croix U.S. Virginia Island. En: Vuysteke, D., R. Swennen , G.F. Wilson and E. De Langhe.1988. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (*Musa* spp. cultivar ABB). *Scientia Horticulturae*,36: 79-88.
- Rodríguez, A.; Ventura, J.; Rodríguez, R.; Pino, J.; López, J.; Román, M. I. 1991. Avances en el programa de mejoramiento genético del banano y el plátano en el INIVIT en Cuba: un avance de investigación. *Infomusa*, 1(1): 3-5.
- Sakai. A; F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28(3), 151-172.
- Sandoval, F. J.A., F.A.C. Tapia; L. Muller; A.V. Villalobos. 1997. Observaciones sobre variabilidad encontrada en plantas micropropagadas de *Musa* cv. 'Falso Cuerno' AAB. *Fruits* vol. 46 no. 5, 1991.
- Sandoval, J.A., 1994. Variations induites par la culture *in vitro* des bananiers (*Musa* AAA, cv. 'Grande naine'). *Eléments de caractérisation morphologique, citologique et hormonale (GA<sub>3</sub>)*, 128 p.
- Singh, H.P.; S. Uma; R. Selvarajan and J.L. Karihaloo. 2011. Micropropagation for Production of Quality Banana Planting Material in Asia-Pacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB), New Delhi, India. 92 p.
- Torres, M.A. 2000. Respuesta a la crioconservación de agregados meristemáticos de plátano. En: Crioconservación de cultivos de reproducción vegetativa para el desarrollo de colecciones principales. Informe de Proyecto CITMA, INIFAT, Cuba, 104 p.
- Vuylsteke, D.R., 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. IBPGR. Practical manuals for handlings crop germplasm *in vitro* 2. 56 p.
- Wang, [My paper]Q.; J. P. T. Valkonen. 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends Plant Sci.* 14 (3):119-122.
- Wang, Q.; J. P. T. Valkonen. 2009. Improved recovery of cryotherapy-treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Cryo Letters*: 30 (3):170-182.
- Wang,Qiaochun; Wilmer J Cuellar, Minna-Liisa Rajamäki, Yukimasa Hirata, Jari P T Valkonen 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol Plant Pathol.* 9 (2): 237-250 .
- Zhu G. Y., J. Geuns, S. Dussert, R. Swennen & B. Panis. 2006. Sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristem cultures in relation to cryopreservation ability. *Physiol. Plant.*128:80-94.