

ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN PARA LA CRIOCONSERVACION DEL GERMOPLASMA DE PIÑA

Roberto Méndez Pelegrín; Julia Martínez; Marcos Edel Martínez Montero.

Centro de Bioplantas Universidad de Ciego de Ávila

robertom@agronomia.unica.cu

Resumen: En la actualidad la Colección Nacional *in vitro* de germoplasma de piña cubano se encuentra en el Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila. Sin embargo, esta tiene como limitante que su almacenamiento es a mediano plazo y requiere de subcultivos continuos. Por lo que, se necesita la implementación de las técnicas de crioconservación de manera exitosa. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplantas con el objetivo de poner a punto un protocolo de vitrificación que permitiera lograr la supervivencia, proliferación y regeneración del germoplasma de piña crioconservado. Se utilizaron ápices de 3 mm de longitud, que contenían el domo apical y dos o tres hojas del primordio, extraídos de vitroplantas de las variedades Cayena lisa Serrana, Española roja y Cabezona provenientes del Banco de Germoplasma *in vitro*. Los ápices fueron subcultivados primero en una solución amortiguadora (sacarosa y glicerol), la cual fue reemplazada por una solución vitrificadora PVS3 (50% m/v glicerol y 50% m/v sacarosa). Se probaron diferentes tiempos de exposición del material vegetal en la PVS3 donde el mejor resultado se obtuvo a las 7 h y la variedad que más respondió al tratamiento fue la Cayena lisa Serrana.

Palabras claves: *Ananas comosus*, ápices, vitroplantas.

Introducción

La predominancia tan alta de la reproducción vegetativa en el cultivo de la piña reduce la presión natural de la fertilidad y su principal componente la auto-incompatibilidad. En esta tendencia influye en gran medida la selección artificial de los genotipos sin semillas (Coppens *et al.*, 1997).

Generalmente, los clones más importantes de *A. comosus* presentan una baja fertilidad y auto-incompatibilidad más acentuada que las especies silvestres y especies que no se cultivan para la obtención de frutos. Otro aspecto importante se manifiesta en cuanto a la pérdida de diferentes variedades que dieron origen a los cultivares actuales, las cuales se han perdido con el paso del tiempo por una selección del hombre para la obtención de variedades mejoradas (Leal y Coppens, 1996).

En Cuba como en el resto del mundo, los recursos fitogenéticos de la piña son conservados generalmente en colecciones de plantas con crecimiento en el campo (Reed *et al.*, 2004). Sin embargo, este tipo de conservación presenta numerosos problemas: el costo de su mantenimiento es alto, y la colección se expone a los riesgos de los desastres naturales, la selección natural y del ataque de plagas y enfermedades (Engels, 2002). Lo que dificulta la distribución y el intercambio entre los bancos genéticos, debido a la naturaleza vegetativa del material y a los riesgos de transferencia de enfermedades.

El desarrollo actual de la biotecnología además de conllevar a que surja la producción de una nueva categoría de germoplasma vegetal, la cual incluye los clones obtenidos a partir de genotipos elites, líneas celulares con atributos especiales, y material transformado genéticamente (Engelmann, 1997), posibilita el uso de determinadas técnicas en pos de la conservación. Diferentes métodos de conservación *in vitro* se emplean y dependen de la duración del tiempo de almacenamiento requerido (Engelmann, 2000).

Estos comprenden el almacenamiento a mediano plazo, así como el almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido conocido como crioconservación (Withers y Engelmann, 1998). Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo para establecer metodologías de conservación *in vitro* a corto-mediano plazo y para la crioconservación en el cultivo de la piña.

La conservación *in vitro* de las accesiones del Banco de Germoplasma del Centro de Bioplasmas, dentro del programa de mejoramiento genético de la piña en Cuba constituye una necesidad prioritaria para perpetuar la especie y garantizar la biodiversidad de la misma en el país. Todo lo anterior subraya la importancia de trazar una estrategia de conservación a largo plazo para el cultivo. Por lo que el objetivo de este trabajo es poner a punto un protocolo de vitrificación que nos permita lograr supervivencia, proliferación y regeneración para ápices crioconservados de vitroplantas de piña.

Materiales y Métodos

Para el desarrollo de los experimentos se emplearon vitroplantas de las variedades Cayena lisa Serrana, Española roja y Cabezona provenientes del banco de germoplasma *in vitro* del Centro de Bioplasmas. Las cuales se encontraban en condiciones de ahijamiento sobre medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2.1 mg/L de BAP y 0.3 mg/L de ANA y crecieron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperíodo de luz artificial de 18 h/día, entre 1500 y 2000 lux de iluminación.

Se utilizaron ápices de 3 mm de longitud, que contenían el domo apical y dos o tres hojas del primordio para realizar los diferentes experimentos. La disección del explante se manipuló bajo un estereomicroscopio en un gabinete de flujo laminar a partir de plantas *in vitro* de 2.5 -3.0 cm de altura luego de 5-6 subcultivos en el medio de propagación. Más tarde, el tejido se cultivó sobre un medio sólido de propagación durante dos días pero suplementado con 0.3M de sacarosa. Para trabajar se seleccionaron los ápices que tenían una coloración verdosa y se desecharon los que presentaban algún tipo de necrosamiento producto de la disección.

Precultivo en solución amortiguadora (loading): La técnica de vitrificación se basó en el protocolo desarrollado por Martínez-Montero *et al.* (2001) pero con ligeras modificaciones. Los explantes precultivados en sacarosa se sometieron a 1 mL de una solución amortiguadora (0.4 M sacarosa y 2.0 M glicerol) en crioviales con capacidad total de 2 ml durante 25 min a $+25^\circ\text{C}$.

Precultivo en solución vitrificadora: Posteriormente la solución amortiguadora se reemplazó de los crioviales por 1 mL de solución vitrificadora PVS3 (50% m/v glicerol y 50% m/v sacarosa). El material vegetal se mantuvo durante diferentes períodos de tiempo a 0°C . La solución vitrificadora de los crioviales se cambió a medio fresco a la mitad del tratamiento.

Crioconservación y Calentamiento: Los crioviales se sumergieron directamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron al menos durante 2 h en estas condiciones. El calentamiento se realizó en un baño de agua a $+40^\circ\text{C}$, durante 2-3 min. Más tarde, la solución PVS3 de los crioviales se reemplazó una vez por 1 mL de una solución de 1.2 M de sacarosa y se mantuvo durante 30 min a $+25^\circ\text{C}$.

Recuperación: Los ápices de los diferentes tratamientos se pasaron a papel de filtro que cubrieron la superficie de placas Petri que contenían el medio de micropropagación suplementado con 0.3 M de sacarosa en la oscuridad. A las 24h los explantes se transfirieron a medio normal de micropropagación y continuaron a la oscuridad durante

una semana. Más tarde se sometieron a condiciones iniciales de luz y humedad durante 45 d.

Ahijamiento: Los ápices que mostraron signos de crecimiento y proliferación durante la recuperación se pasaron a un medio de ahijamiento para su multiplicación, compuesto por medio basal MS y suplementado con ANA (0.3mg/L) y BAP (2.1 mg/L).

Evaluación de supervivencia y Regeneración: Los ápices se consideraron vivos al observar algún crecimiento de los mismos a los 45 días de incubación en medio de micropropagación después de ser sometidos al proceso de crioconservación. Los ápices que proliferaron se pasaron a las condiciones de ahijamiento y se evaluó el porcentaje del total de explantes que regeneraron plantas en estas condiciones durante 45 días. Cada tratamiento fue replicado dos veces con al menos 15 ápices por placa Petri.

Resultados.

En la Tabla 1 se muestra el comportamiento de la supervivencia para las tres variedades estudiadas utilizando la solución amortiguadora 2M glicerol + 0.4M sacarosa y la solución vitrificadora PVS3 durante diferentes períodos de tiempo. Se observó una respuesta marcada de tolerancia a la congelación en NL por el efecto del PVS3 durante 7 horas de exposición para todas variedades.

Tabla 1. Efecto de la exposición de la PVS3 sobre la supervivencia de los ápices de piña vitrificados (-NL) y enfriados en nitrógeno líquido (+NL) según las variedades.

Duración de exposición a PVS3 (h)	Supervivencia (%)					
	Cayena lisa		Cabezona		Española roja	
	-NL	+NL	-NL	+NL	-NL	+NL
0	100	0	100	0	100	0
3	90±8	0	87±8	0	85±6	0
5	75±4	10±3	74±8	8±1	73±4	0
7	70±3	65±2	73±4	43±3	70±4	35±5
9	33±7	15±4	23±6	0	8±3	0

En la Tabla 2 se muestra el efecto que presenta el protocolo en forma general de crioconservación sobre la regeneración de plantas a partir de los ápices crioconservados. En este sentido existe una tendencia a la disminución de la tasa de regeneración, la cual solamente se puede contrarrestar por la utilización de la micropropagación a partir de los ápices que presentan supervivencia y proliferación después de la congelación en NL.

Tabla 2. Efecto del protocolo de vitrificación sobre la regeneración de los ápices para las tres variedades estudiadas antes (-NL) y después (+NL) del nitrógeno líquido. El tiempo de exposición de los ápices a la solución PVS3 fue de 7 h.

Variedades	Regeneración (%)	
	-NL	+NL
Cayena lisa	67±4	45±3
Cabezona	63±5	33±2
Española roja	47±5	25±3

Discusión.

La técnica de vitrificación utilizada brinda resultados positivos de supervivencia y regeneración de vitroplantas a partir de ápices crioconservados. Esto es posible debido a que se evita en gran medida la congelación intracelular letal que ocurre como resultado de la exposición rápida del tejido en nitrógeno líquido (Sakai y Yoshida, 1967). Por lo que, el material vegetal a crioconservar debe estar suficientemente deshidratado para facilitar su vitrificación antes de sumergirlo en NL.

Durante el proceso de vitrificación se eliminó la necesidad de una congelación lenta controlada y la deshidratación del tejido se logra al utilizar soluciones vitrificadoras altamente concentradas. Sin embargo, la vitrificación tiene los inconvenientes de los efectos tóxicos que pueden presentar algunos compuestos en las soluciones vitrificadoras sobre el tejido vegetal, y además es difícil el tratamiento cuidadoso de gran cantidad de material a la vez.

Las soluciones vitrificadoras son muy dañinas debido a la acción tóxica de compuestos individuales como el DMSO (Dimetilsulfóxido) o de la acción combinada del estrés osmótico en la viabilidad celular (Matsumoto *et al.*, 1994). Para vencer estos obstáculos un complicado proceso de equilibrio se debe lograr durante un período de exposición del tejido a la temperatura preferiblemente de 0°C, y además se necesitan de las llamadas soluciones amortiguadoras (loading solutions), las cuales contribuyen a minimizar los efectos dañinos a nivel de las membranas. En nuestro caso se utilizó con éxito la mezcla 2M glicerol y 0.4M sacarosa, la cual se ha informado como muy efectiva para la inducción de la deshidratación y la tolerancia a la congelación en varias especies a nivel celular y meristemático (Sakai *et al.*, 1991; Nishizawa *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 1994). Nishizawa *et al.* (1993) confirmaron que la mezcla 2M glicerol y 0.4M sacarosa produce a -30°C en la fracción no congelable de la solución y en el citosol una concentración de solutos suficiente para vitrificar a la inmersión directa en NL.

Por otra parte, algunos autores han planteado que la mezcla 50% glicerol y 50% sacarosa (denominada solución PVS3) ha sido más efectiva que la PVS2 debido al efecto tóxico que puede presentar esta última en especies o variedades con respecto al DMSO presente, así como al efecto positivo que posee la alta concentración del glicerol en la PVS3 (Yongjie *et al.*, 1997; Sakai y Matsumoto, 1996). Y la utilización del domo apical cubierto con dos primordios foliares como explante se considera una buena elección para la vitrificación debido a sus características morfológicas. Takagi *et al.* (1997) demostraron que los peciolos de las hojas jóvenes presentan superficies rugosas con cera lo cual hace posible que los ápices son atrapados, y no permitan la fácil permeabilidad de la solución vitrificadora. Por lo que se requieren períodos prolongados de exposición a dicha solución lo cual en ocasiones conlleva a un detrimento en la sensibilidad del material.

La utilización exitosa de la vitrificación depende del control cuidadoso de los procesos de deshidratación y la permeabilidad de los crioprotectores, así como la prevención de los daños inducidos por el estrés osmótico y toxicidad química durante la deshidratación (Rall, 1987). Para extender la aplicación de esta técnica a un amplio rango de cultivares se requieren llevar a cabo estudios esenciales de preacondicionamiento de la congelación y la tolerancia a la deshidratación. Esto va acompañado por la acumulación de azúcares, lo cual incrementa la permeabilidad de las membranas celulares bajo condiciones severas de deshidratación y conlleva a la producción de ABA, prolina y ciertas proteínas incluyendo las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía. Por lo

tanto, estudios bioquímicos posteriores son necesarios para optimizar el protocolo y hacerlo extensivo a un número mayor de variedades.

Conclusiones

- Se pudo definir un protocolo de vitrificación para lograr supervivencia, proliferación y regeneración para ápices de piña crioconservados.
- El mejor tiempo de exposición del material vegetal resultó ser de 7 h para todas las variedades. Aunque la variedad Cayena lisa Serrana mostró un comportamiento superior frente a las otras dos.

Recomendaciones.

- Se recomienda continuar estudios para elevar el porcentaje de regeneración el cual podrá ser mas bajo para otras variedades de piña menos resistentes a la deshidratación osmótica de las soluciones vitrificadoras y la congelación.
- Se recomienda para investigaciones posteriores, realizar estudios bioquímicos que nos indiquen el comportamiento

Bibliografía

- Coppens d'Eeckenbrugge G, Leal F, Duval MF (1997) Germplasm resources of pineapple. Hort. Rev., 21:133-175.
- Engelmann, F. (1997). In vitro conservation methods. CAB INTERNATIONAL. Biotechnology and Plant Genetic Resources. 119-161.
- Engelmann, F. (2000) Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón / IPGRI, Roma, Italia. pp. 8-20.
- Engels, J.M.M. (2002) Genebank management: an essential activity to link conservation and plant breeding. Plant Genetic Resources Newsletter, 129: 17-24.
- Leal F y Coppens d'Eeckenbrugge G (1996) Pineapple. En: Jules Janick y James N. Moore (editores). Fruit Breeding. Ed. John Wiley & Sons, Inc. :515-557.
- Martínez-Montero ME, González-Arnao MT, Benega R, Martínez J, Engelmann F (2001) Application of cryopreservation techniques of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) germplasm for long-term storage. Cryo-Letters, 22: 85-86.
- Matsumoto, T.; Sakai, A.; Yamada, K. (1994). Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Rep. 13: 442-446.
- Matsumoto, T.; Sakai, A.; Yamada, K. (1994). Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Rep. 13: 442-446.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Nishizawa, S.; Sakai, A.; Amano, Y.; Matsuzawa, T. (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Sci. 91: 67-73.
- Rall, W.F. (1987). Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology, 24: 367-402.
- Reed, B.M.; Engelmann, F.; Dulloo, M.E.; Engels, J.M.M (2004) Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. En: IPGRI Handbooks for genebanks No.7 International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Sakai, A.; Kobayashi, S.; Oiyama, I. (1991). Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. J. Plant Physiol. 137: 465-470.

- Sakai, A.; Matsumoto, T. (1996). In vitro Coinservation of Plant Genetic Resources, MN Norhmah, MK Narimah, MM Clyde (eds.). Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Life sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia, bangi, pp. 105-118.
- Sakai, A.; Yoshida, S. (1967). Survival of plant tissue at super-low temperatures. I. Effects of cooling and rewarming rates on survival. *Plant Physiol.* 42: 1695-1701.
- Takagi, N.; Tien Thinh, N.; Islam, O.M.; Seboku, T; Sakai, A. (1997) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro by vitrification. *Plant Cell Rep.* 16: 594-599.
- Withers LA y Engelmann F (1998) In vitro conservation of plant genetic resources. En A. Altman (ed.). *Biotechnology in Agriculture*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 57-88.
- Yongjie, W.; Engelmann, F.; Frattarelli, A.; Damiano, C.; Withers, L.A. (1997). Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures. *Cryo-Letters*, 18: 317-324.