



# ESTRATEGIA CRIOGÉNICA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE PIÑA (*Ananas comosus* var. *Comosus*)

## Cryogenic strategy for the establishment of a germplasm bank of pineapple (*Ananas comosus* var. *Comosus*)

**Ariel Villalobos Olivera<sup>1</sup>✉, Roberto Méndez Pelegrín<sup>1</sup>, Lelurlys Nápoles Borrero<sup>2</sup>, Justo González Olmedo<sup>2</sup>, Alitza Iglesias Alfonso<sup>2</sup>, Julia Martínez Rodríguez<sup>2</sup>, René C. Rodríguez Escriba<sup>2</sup>, Gustavo Y. Lorente González<sup>2</sup>, Nicolás Quintana Bernabé<sup>1</sup>, Romelio Rodríguez Sánchez<sup>2</sup>, Fernanda Vidigal Duarte Souza<sup>3</sup> y Marcos E. Martínez Montero<sup>2</sup>**

**ABSTRACT.** In pineapple have been used cryopreservation protocols based on a vitrification procedure. However, the influence of some technical factors is still unknown to achieve a strategy cryogenic routine application to a wide range of genotypes. Furthermore, there has been no histological analysis to display any structural changes during a process of cryopreservation. In the present investigation different technical aspects of a cryogenic strategy are determined to increase survival levels from the apexes to immersion in liquid nitrogen. These were: type of apex, consisting of 3-4 leaf primordia with an approximate size of 2,5-3mm; preculture 0,3 mol L<sup>-1</sup> sucrose; application of the loading solution 0,4 mol L<sup>-1</sup>+2 0,4 mol L<sup>-1</sup> mol glycerol; application temperature of the vitrification solution PVS2 at 0 °C for 420 min. The analysis of the display of structural changes in the cryopreserved apices revealed that the meristematic cells in the apical dome and leaf primordia in formation, suffered few cellular alterations and kept almost intact its morpho-physiological characteristics in the best conditions of survival. The method of vitrification was applied successfully for 9 accessions of the *in vitro* genebank of Bioplant center. This is an important step for the establishment of a gene bank for long-term cultivation of pineapple.

**RESUMEN.** En la piña se han utilizado protocolos de crioconservación basados en un procedimiento de vitrificación. Sin embargo, se desconoce aún la influencia de algunos factores técnicos para lograr una estrategia criogénica con una aplicación de rutina a un amplio número de genotipos. Además hasta la fecha, no se han realizado ningún análisis histológico para visualizar cambios estructurales durante un procedimiento de crioconservación. En la presente investigación se determinaron diferentes aspectos técnicos de una estrategia criogénica para aumentar los niveles de supervivencia de los ápices a la inmersión en nitrógeno líquido. Estos fueron: tipo de ápice, compuesto por 3-4 primordios foliares con un tamaño aproximado de 2,5-3mm; precultivo en 0,3 mol L<sup>-1</sup> de sacarosa; aplicación de la solución de carga 0,4 mol L<sup>-1</sup>+2 0,4 mol L<sup>-1</sup> glicerol; temperatura de aplicación de la solución vitrificadora PVS2 a 0 °C durante 420 min. El análisis de la visualización de los cambios estructurales ocurridos en los ápices crioconservados reveló que las células meristemática presentes en el domo apical y los primordios foliares en formación, sufrieron pocas alteraciones celulares y mantuvieron casi intacta sus características morfo-fisiológica en las mejores condiciones de supervivencia. Se aplicó de manera exitosa un procedimiento de vitrificación para nueve accesiones del banco de germoplasma *in vitro* del centro de Bioplasmas. Lo anterior constituye una importante etapa para el establecimiento de un banco de germoplasma a larga plazo del cultivo de la piña.

**Key words:** apices, germplasm, histology, vitrification

**Palabras clave:** ápices, germoplasma, histología, vitrificación

<sup>1</sup> Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Cuba.

<sup>2</sup> Centro de Bioplasmas, UNICA, Cuba.

<sup>3</sup> EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Brasil.

✉ ariel@unica.cu

## INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* var. *Comosus*) es uno de los principales frutales del mundo, es cultivada con el fin de satisfacer necesidades alimenticias de la población y constituye un importante renglón para la producción de conservas y venta de fruta fresca (1). Esta fruta después del banano y el mango, es la fruta tropical más importante, con una producción mundial en el año 2012 que alcanzó 23 333 886 toneladas (2).

La piña para Cuba constituyó una de las principales plantaciones de la provincia de Ciego de Ávila, recayendo más del 80 % de la producción nacional en la variedad Española roja, de bajo potencial reproductivo, aunque en los últimos años se han introducido nuevos cultivares como el Cayena lisa y el 'MD-2', de buenos rendimientos, pero son más exigente a las condiciones ambientales (1, 2, 3).

En la actualidad, los recursos genéticos de la piña son conservados generalmente en colecciones de campo (4). Además se utilizan las técnicas de cultivo *in vitro*, como alternativa para responder a las necesidades de conservación de genes (5). Sin embargo, hasta la fecha, la opción más prometedora para el almacenamiento a largo plazo es la crioconservación mediante la creación de un banco genético básico donde los cultivos se almacenarían en espacio reducido, protegidos de las contaminaciones y con un mantenimiento limitado (6, 7, 8, 9). El material vegetal se transfiere a nitrógeno líquido, en el cual la temperatura es suficientemente baja (-196 °C), para que se suspenda el metabolismo y se eviten los procesos que reducen la estabilidad genética durante el almacenamiento (10, 11, 12).

En la crioconservación de especies que se propagan vegetativamente, los tejidos organizados tales como ápices o meristemas son de preferencia por su estabilidad genética (13, 14). Además, éstos se recomiendan como el explante por excelencia a almacenar germoplasma porque se pueden obtener plantas libres de virus (crioterapia) regeneradas directamente a partir de estos materiales crioconservados (15, 16).

En el caso de la piña se han utilizado protocolos basados en un procedimiento de vitrificación (17, 18). En los últimos años se ha implementado la técnica de micro-goteo/vitrificación en ápices de piña donde se ha logrado incrementar la supervivencia de los ápices (19, 20). Sin embargo, se desconoce aún la influencia de algunos factores técnicos para lograr una estrategia criogénica con una aplicación de rutina a un amplio número de genotipos de piña. Además se han realizado pocas investigaciones para visualizar los cambios estructurales a nivel celular durante las diferentes etapas de un procedimiento de crioconservación. Por lo que este trabajo tuvo como objetivo determinar diferentes aspectos técnicos de una

estrategia criogénica que aumenten la supervivencia en nitrógeno líquido para ápices de vitroplantas de piña, visualizar los cambios estructurales por histología durante la crioconservación y aplicar el procedimiento de vitrificación para nueve accesiones del banco *in vitro* de germoplasma de piña.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplasmas de la (Universidad de Ciego de Ávila), utilizando como material vegetal vitroplantas de piña (*Ananas comosus* var. *Comosus*) 'MD-2' provenientes de un Banco de germoplasma *in vitro* micropropagadas según el protocolo establecido (21).

### **Etapas I. Acondicionamiento de las vitroplantas donantes:**

Se utilizaron vitroplantas después de cuatro subcultivos. Multiplicadas en medio de cultivo líquido con sales MS+100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol +2,1 mg L<sup>-1</sup> BA+ 0,3 mg L<sup>-1</sup> ANA +1,0 mg L<sup>-1</sup> Tiamin +30 g L<sup>-1</sup> sacarosa (0,08 mol L<sup>-1</sup>), con un pH del medio ajustado a 5,67 según Skoog (22). Las plantas se subcultivaron cada 30 días y crecieron a 27±2°C y fotoperíodo de luz artificial de 18 h día<sup>-1</sup>, entre 1500 y 2000 lux de iluminación.

### **Etapas II. Pre-cultivo de ápices: Se utilizaron dos tipos de ápices:**

ápices tipo I (2,5-3 mm de longitud) con una pequeña base apical y tres a cuatro primordios foliares que lo cubrían; y ápices con la pequeña base apical con uno o dos primordios foliares (ápices tipo II) (0,8-1,3 mm de longitud), para luego determinar el tipo de ápice más adecuado antes y después de inmersión en nitrógeno líquido durante un tiempo de (0-30 min). La disección del explante se realizó bajo un estereomicroscopio (ACUS SCOPE) en un gabinete de flujo laminar a partir de vitroplantas. Los ápices se cultivaron durante dos días, cinco ápices por placa de Petri que contenían un medio de cultivo MS semisólido suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> Mioinositol 1,0 mg L<sup>-1</sup>, Tiamina 30 g L<sup>-1</sup> y 0,08 mol L<sup>-1</sup> sacarosa. Luego se determinó los efectos del precultivo en sacarosa suplementando 0,1; 0,3; 0,5 y 0,7 mol L<sup>-1</sup> de sacarosa, para mejora de la supervivencia de los ápices crioconservados. Después se determinó el efecto de la solución de carga, teniendo en consideración los mejores tratamientos del experimento anterior, donde los explantes precultivados en sacarosa se sometieron a 1mL de las soluciones de carga (0,4 mol L<sup>-1</sup> sacarosa+ 2,0 mol L<sup>-1</sup> glicerol; 0,75 mol L<sup>-1</sup> sacarosa+ 1,0 mol L<sup>-1</sup> glicerol) en crioviales con capacidad total de 2 ml durante 25 min a 25 °C.

### **Etapas III. Deshidratación con la solución vitrificadora PVS2:**

A los dos días de precultivo los ápices pasaron a los crioviales (2mL de volumen total) que contenían 1,5 mL de solución de PVS2 a temperatura ambiente ±25 °C. El material vegetal se mantuvo durante un período

de tiempo (0-30 min) a 25 °C, para determinar el tiempo de deshidratación en PVS2. Después se determinó el tiempo de deshidratación en PVS2 del material en un periodo de tiempo (0-180 min) a 25 °C de acuerdo vegetal según la aplicación de la solución de carga antes de la inmersión en nitrógeno líquido y posterior a la inmersión en nitrógeno líquido. Además, es necesario señalar que se realizó la evaluación del número total de grupos OH por la fórmula siguiente: Molaridad \* NA \* [OH] Donde, NA- Constante de Avogadro  $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ , [OH] grupos OH por molécula.

Después para mejorar la supervivencia de los ápices durante la crioconservación se evaluó el efecto de la temperatura teniendo en consideración los mejores tratamientos de los acápites anteriores con las siguientes modificaciones, donde el material vegetal se mantuvo durante un período de tiempo (0-540 min) a 25 °C y 0 °C.

**Etapa IV. Inmersión en nitrógeno líquido:** Posteriormente los crioviales se sumergieron en nitrógeno líquido y se mantuvieron por 2 h en estas condiciones.

**Etapa V. Calentamiento:** El calentamiento de los crioviales se realizó en un baño de agua a (+) 40 °C, durante 2-3 min.

**Etapa VI. Destoxificación (solución de descarga):** La solución vitrificadora PVS2 de los crioviales se reemplazó una vez por 1 mL de una solución de  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarosa y se mantuvo durante 30 min a 25 °C.

**Etapa VII. Recuperación:** Los ápices de los diferentes tratamientos se pasaron a papel de filtro que cubrió la superficie de placas de Petri que contenía el medio de micropropagación pero desprovistos de los reguladores del crecimiento.

**Etapa VIII. Evaluación de supervivencia:** A la semana, los ápices se transfirieron a placas de Petri que contenían medio de micropropagación con idénticas condiciones iniciales  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperíodo de luz artificial de 18 h día<sup>-1</sup>, entre 1500 y 2000 lux de iluminación, durante tres semanas. La evaluación de la supervivencia se realizó según lo establecido por Martínez- Montero (23), considerando la porcentaje de supervivencia, el número de ápices que mostró síntomas de recrecimiento a las cinco semanas de recuperación midiéndole su tamaño. Los porcentajes de supervivencia se expresaron con respecto al total de ápices usados por tratamiento.

#### **Análisis histológico durante la crioconservación de ápices de piña**

El análisis histológico se realizó a partir de muestras de ápices deshidratados y crioconservados del cultivar MD2 los cuales fueron sometidos durante 0, 180, 300, 420 y 540 min en la solución vitrificadora PVS3 a 0 °C.

Se siguió un procedimiento similar para todas las muestras. Estas se fijaron en solución F.A.A (formol - ácido acético - alcohol etílico) al 5-5-50 % (v/v), respectivamente. A continuación se lavaron en

agua corriente durante 24 h para eliminar el exceso de fijador. Una vez concluido el lavado, el tejido fue deshidratado en concentraciones seriadas de alcohol etílico (30, 50, 70, 80 y 90 %) y tres veces por alcohol etílico absoluto, durante 2 h cada pase. Después del proceso de deshidratación las muestras se aclararon en alcohol- Bencol (50 % v/v), Luego se continuó la deshidratación en tres pases de Bencol durante 1 h y finalmente se embebieron en una serie de tres pases de parafina con un período de impregnación de 1 h por pase. Seguidamente se incluyeron en bloques de parafina a los que se le realizaron cortes seriados con un grosor de 20  $\mu\text{m}$ , en un micrótopo manual de deslizamiento vertical. La técnica de tinción utilizada fue la tinción de Flemming (24). Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio Carl Zeiss al cual se le acopló una cámara digital Canon Power Shot A620 con la que se tomaron todas las imágenes.

Después de realizado el procedimiento de vitrificación, fue validado en nueve accesiones del banco de germoplasma nacional piña, tomando en consideración los mejores tratamientos de los acápites anteriores (Tabla I). Además de la evaluación de la supervivencia, de los ápices deshidratados y crioconservados, respectivamente a las seis semanas de incubación.

#### **Tratamiento estadístico de los datos**

Se realizaron experimentos monofactoriales con más de dos niveles, con cinco repeticiones y se aplicó un diseño completamente aleatorizado. En el procesamiento estadístico de los datos se empleó el utilitario SPSS para Windows (25). En todos los casos se comprobó la distribución normal de los datos mediante la prueba de homogeneidad de las varianzas a través de la prueba Levene. Se realizaron pruebas aramétricas (ANOVA y Tukey)  $p < 0,05$ . En algunos casos se necesitó la transformación de datos según  $x' = 2 \arccos((x/100)^{0,5})$ .

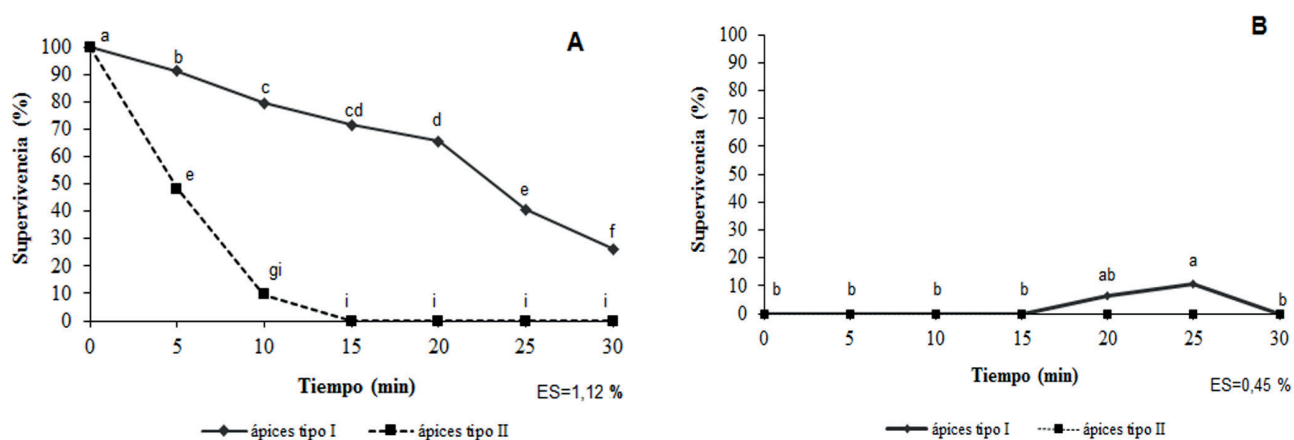
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Figura 1 se observó una mayor tolerancia con diferencias significativas para los ápices del tipo I (Figura 1A) con respecto a los ápices del tipo II (Figura 1B). Los ápices del tipo I soportaron los niveles de deshidratación al PVS2 tres veces más, hasta los 30 min de exposición.

Cuando se realizó una observación al microscopio óptico también se evidenciaron diferencias entre los tipos de ápices utilizados. La Figura 2 muestra la sección longitudinal de los dos tipos de ápices. El ápice tipo I (Figura 2A), consta de 3 a 4 primordios foliares, que garantizan cierto grado de protección al meristemo, y un ápice tipo II (Figura 2B) compuesto por uno o dos primordios foliares donde el meristemo queda prácticamente descubierto, los cuales resultaron ser más susceptibles a los tratamientos de deshidratación.

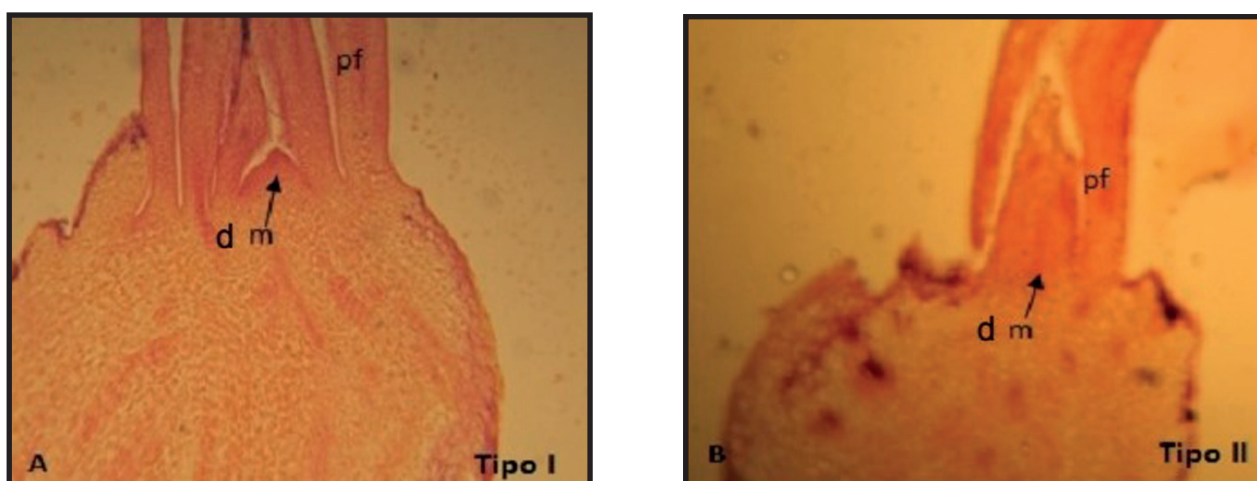
**Tabla I. Acciones del Banco *in vitro* de germoplasma de piña que se utilizaron en la validación de la estrategia criogénica**

Número	Género	Especie	Grupo horticultural	Cultivar
1	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cabezona
2	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Española Roja P3R5
3	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Española Roja del Caney
4	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Cayena lisa Serrana
5	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	MD2
6	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Cayena de Puerto Rico
7	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Maipure	Perolera
8	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Pernambuco	Piña blanca
9	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Género afín	Piñuela Karata



Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ ). Los datos se transformaron para el análisis según  $x' = 2 \arcsen ((x/100)^{0,5})$

**Figura 1. Supervivencia del ápice en la supervivencia antes de la inmersión en nitrógeno líquido (A) y posterior a la inmersión en nitrógeno líquido (B)**



A: ápice tipo I con primordios foliares en desarrollo que le sirven de protección al meristemo apical  
 B: ápice tipo II desprovisto de primordios foliares

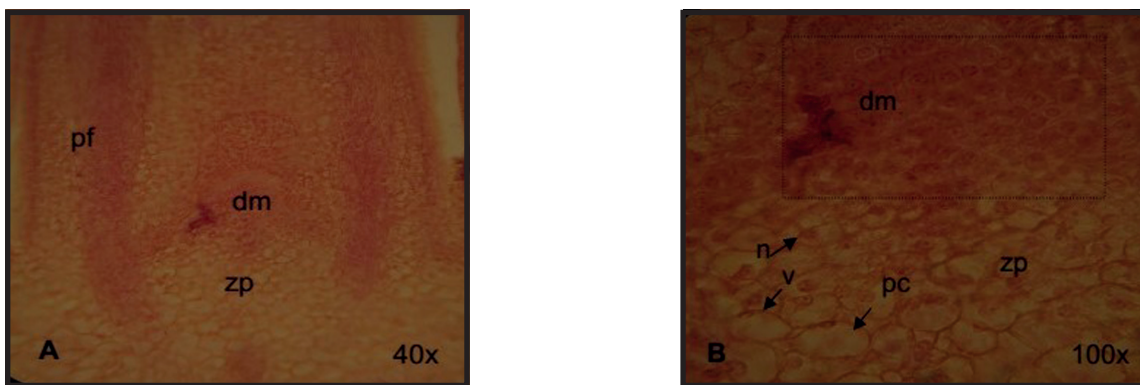
**Figura 2. Vista general del material vegetal utilizado en los experimentos de crioconservación**

Generalmente, diversos autores aceptan, que para una criopreservación exitosa de los ápices, éstos deben consistir en un domo meristemático más uno o dos primordios foliares con un tamaño de 0,5-2 mm de longitud, dependiendo de las especies (26). Sin embargo, se recomienda, que es necesaria una selección apropiada del tamaño y el estado de desarrollo del material inicial como factor esencial para alcanzar altas tasas de recuperación después del calentamiento (27). Por lo anterior se seleccionaron los ápices de tipo I para continuar en la estrategia criogénica en los siguientes experimentos.

En contraste con los resultados de tolerancia obtenidos anteriormente solo se observó un 5,3 % de supervivencia para los ápices del tipo I cuando a los 25 min se deshidrataron por la solución vitrificadora

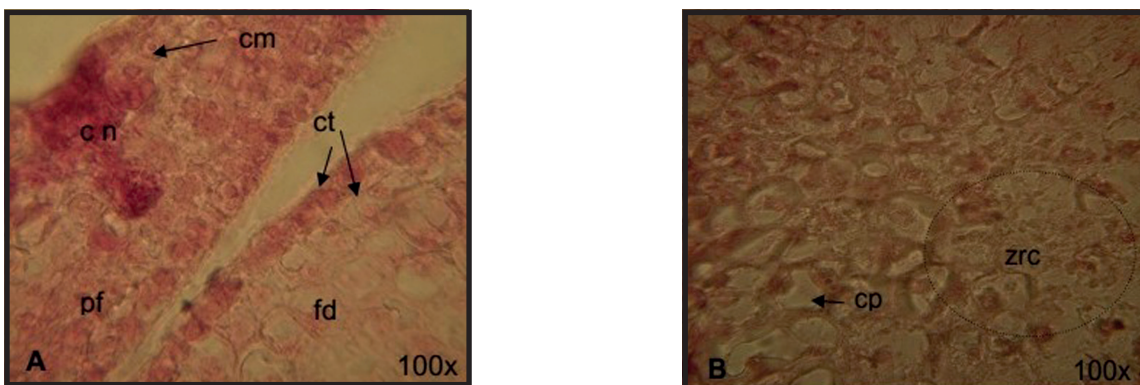
PVS2, se enfriaron en nitrógeno líquido. Al realizar la evaluación de la coloración del tejido se observó que en la totalidad de los casos si éstos se mantenían de color verde intenso, podían recrecer a los 45 días de evaluación. Sin embargo, si cambiaban de coloración verde hacia amarilla-pálida no podían crecer, y por lo tanto morían.

Por otro lado, y para comparar el comportamiento de los ápices seleccionados en las Figuras 3 y 4 se muestra la histología realizada a ápices de tipo I sin tratamientos crioprotectores (tiempo 0) antes (Figura 3A y B) y después (Figura 4A y B) de la inmersión en nitrógeno líquido. Los explantes estuvieron formados por el domo meristemático o meristemo apical (Figura 3A y 4A) y una zona subapical de células parenquimáticas (Figura 3B y 4B).



A. primordio foliar (pf), domo meristemático (dm) y zona parenquimática subapical (zp). B. ampliación de la zona parenquimática con células grandes vacuoladas (v), paredes celulares ligeramente engrosadas (pc) y núcleos más o menos céntricos (n)

**Figura 3. Microfotografías de ápices del brote en la variedad MD2 sin tratamientos crioprotectores, antes de la inmersión en nitrógeno líquido**



A. Flanco del domo (fd) y primordio foliar (pf). Obsérvese células necróticas (cn), células meristemáticas con paredes celulares anormalmente engrosadas (cm) y muy vacuoladas y capas de la túnica multiseriada (ct). B. Zona parenquimática subapical donde se observan zonas de ruptura celular (zrc) con restos de paredes celulares y contenido nucleoplasmático disperso. Nótese la presencia de células parenquimáticas con paredes celulares muy engrosadas y núcleo adosado (cp).

**Figura 4. Microfotografías en ápices vegetativos de la variedad MD2 sin tratamientos crioprotectores, después de la inmersión en nitrógeno líquido**

La histología de los ápices sin tratamientos crioprotectores antes de la inmersión en nitrógeno líquido mostró que las células de la zona subapical o células parenquimáticas (Figura 4B), se presentan más grandes con paredes celulares más o menos engrosadas, vacuolas más grandes en comparación con la zona meristemática. No existe una clara definición en cuanto a la formación del meristemo en fila (rib meristem) como se observa claramente en plantas adultas desarrolladas *ex vitro*.

Por su parte, en la histología de los ápices sin tratamientos crioprotectores después de la inmersión en nitrógeno líquido, se observó que en la zona apical (Figura 4A) existió heterogeneidad celular, donde algunas células conservaron sus características meristemáticas, en el caso de los estratos celulares correspondiente a las células más jóvenes del domo meristemático, se observaron células necróticas, células meristemáticas con paredes celulares anormalmente engrosadas y con pequeñas vacuolas o espacios eriplamáticos, además las capas de la túnica se mostraron multiseriadas. Mientras que en la zona parenquimática subapical (Figura 4B), las células estuvieron más vacuoladas, algunas fueron dañadas, mostrando zonas de ruptura celular, con restos de paredes celulares y contenido núcleo plasmático disperso. Nótese la presencia de células parenquimáticas con paredes celulares muy engrosadas y núcleo adosado. Finalmente se observó que existió un número de células con el citoplasma contraído en la pared celular.

Semejantes observaciones fueron realizadas por (28) en meristemos de *Musa spp*, donde en los meristemático no enfriados las células mantenían forma más o menos regular y no se distinguían vacuolas en su citoplasma. Sin embargo, después de congelar las muestras por debajo de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , observaron que a medida que las células eran menos meristemáticas existía un incremento en número y tamaño de las vacuolas presentes en estas.

Como era esperado para una concentración de sacarosa de  $0,3\text{ mol L}^{-1}$  se alcanzaron los mejores niveles de supervivencia para los ápices posterior a la inmersión

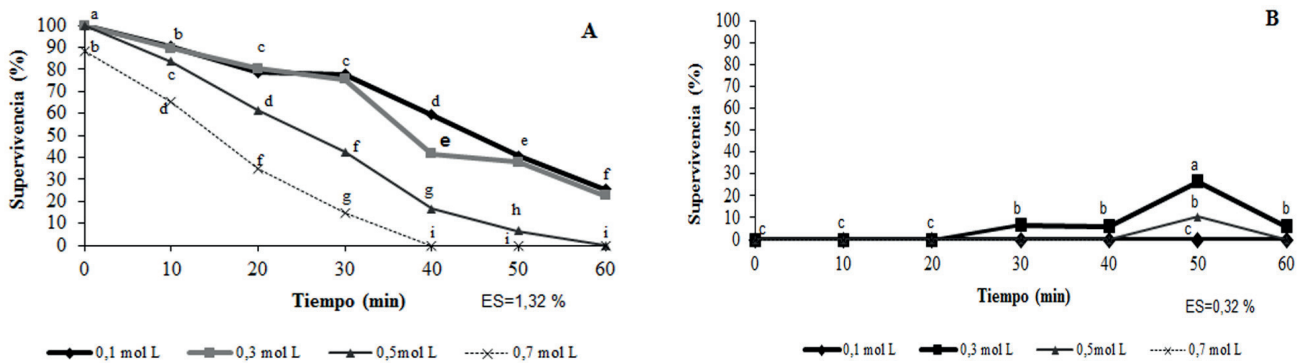
en nitrógeno líquido y al calentamiento (Figura 5B). Por lo tanto, esta concentración de sacarosa se seleccionó para continuar la experimentación. Los resultados de diferentes grupos de investigación son variados en el sentido de estandarizar concentraciones apropiadas de sacarosa durante la crioprotección. Para cada material a crioconservar debe encontrarse la concentración adecuada ya que esta varía según la especie o explante (4, 13, 28).

Cuando se emplea sacarosa se debe determinar la concentración adecuada que toleran las células antes de iniciar el proceso de crioconservación, basado en dos aspectos fundamentales, la deshidratación osmótica y la toxicidad a las células (4). Los resultados más importantes de este experimento fue la selección de la concentración de sacarosa de  $0,3\text{ mol}^*\text{L}^{-1}$  para continuar la experimentación.

En la Figura 6 se observó que los niveles de tolerancia a la deshidratación por la solución PVS2 se incrementaron notablemente al emplear los tratamientos de la solución de carga hasta 180 min (Figura 6A).

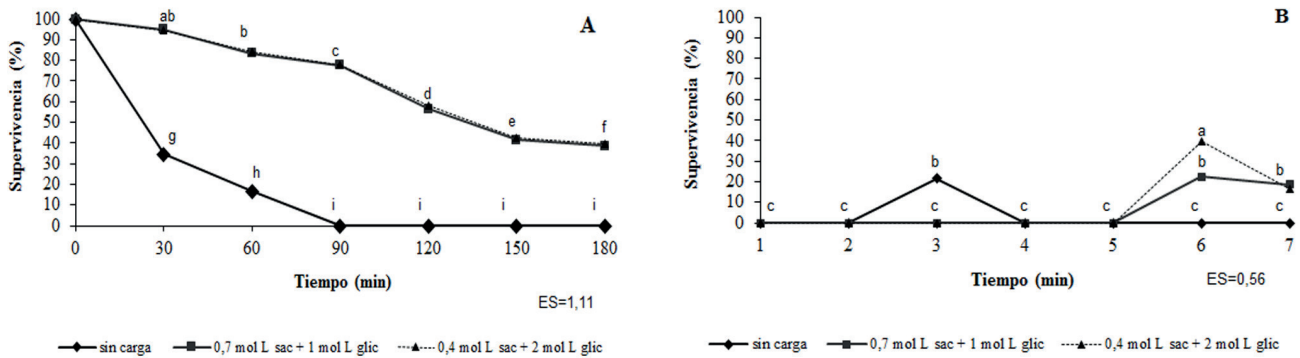
Por su parte, los niveles de supervivencia a la crioconservación también se elevaron hasta un 40 %, con diferencias significativas a los 150 min de deshidratación en PVS2 a favor de la mezcla crioprotectora de sacarosa  $0,4\text{ mol}^*\text{L}^{-1}$  y glicerol  $2\text{ mol}^*\text{L}^{-1}$  (Figura 6B), por lo que ésta última será la solución de carga que se empleará en los siguientes experimentos. Sin embargo, se evidenció que no fue posible obtener un incremento en la supervivencia de los ápices aunque se utilice un mayor tiempo de incubación.

Lo anterior coincide con los resultados publicados con respecto a la utilización del tiempo de pre-tratamiento en las concentraciones de glicerol y sacarosa mediante los procedimientos de vitrificación (9, 12). Lo que indica que es el tiempo adecuado para que se activen los mecanismos necesarios involucrados en la tolerancia de las células a los diferentes momentos estresantes en una estrategia de crioconservación.



A: antes de la inmersión en nitrógeno líquido B: posterior a la inmersión en nitrógeno líquido  
Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ )  
Los datos se transformaron para el análisis según  $x' = 2 \arcsen ((x/100)0,5)$

**Figura 5. Efecto del tiempo de deshidratación en PVS2 en la supervivencia de los ápices (según el precultivo en sacarosa)**



A: antes de la inmersión en nitrógeno líquido      B: posterior a la inmersión en nitrógeno líquido  
 Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, p<0,05)  
 Los datos se transformaron para el análisis según  $x' = 2 \arcsen ((x/100)0,5)$

**Figura 6. Efecto del tiempo de deshidratación en PVS2 en la supervivencia de los ápices (según la aplicación de la solución de carga)**

Cuando se determinó el número total de grupos OH por moléculas de las mezclas utilizadas (sacarosa + glicerol) para comparar los resultados de supervivencia con diferencias estadísticas obtenidos en la Figura 6. Para el caso de la mezcla 0,4 mol\*L<sup>-1</sup> sacarosa + 2,0 mol\*L<sup>-1</sup> glicerol rinde 55,402 x 10<sup>23</sup> grupos OH total por moléculas mientras que la mezcla 0,75 mol\*L<sup>-1</sup> sacarosa + 1,0 mol L<sup>-1</sup> glicerol rinde 54,198 x 10<sup>23</sup> grupos OH total por moléculas. De esta forma es evidente el porqué de las diferencias significativas. El reordenamiento de los grupos hidroxilo de las moléculas de diferentes azúcares y poli-alcoholes constituye un factor importante para una efectiva criopreservación<sup>A</sup>.

En la Figura 7 se muestran los resultados al disminuir la temperatura de aplicación del PVS2. Se observó un aumento en el tiempo de tolerancia hasta los 480 min (Figura 7A) y los máximos valores de supervivencia a la criopreservación se incrementaron hasta un 45 % a los 420 min de exposición al PVS2 (Figura 7B). Por lo tanto, en la continuación de la estrategia criogénica se disminuirá la temperatura hasta 0 °C para aplicar el PVS2.

Según Takagi (29) en la criopreservación de ápices de brotes de especies tropicales mejora la supervivencia de *Dioscorea alata* a la criopreservación desde un 47 % hasta un 91 % disminuyendo la temperatura desde 25 °C hasta 0 °C durante la deshidratación por PVS2). En la actualidad existen evidencias de estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido donde varios autores hipotetizan al respecto (15). Los autores plantean que el mecanismo de protección del PVS2 no solo está relacionado con la no formación de cristales de hielo, sino que además se basa en la restricción de la movilidad molecular y

la desorganización de la estructura de los cristales de hielo.

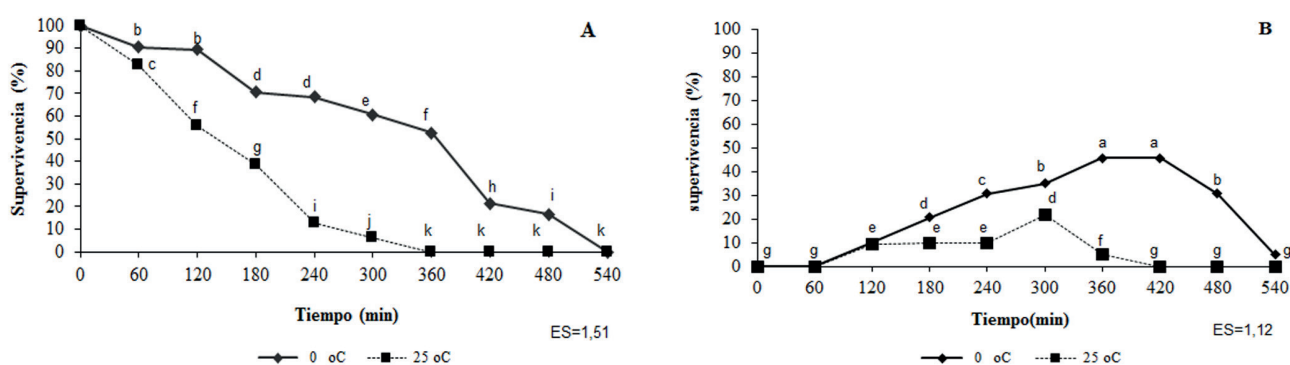
En la Figura 8 se observó que existieron claras evidencias estadísticas donde la solución vitrificadora PVS2 (Figura 8 A) es menos efectiva que la PVS3 (Figura 8 B) para el caso de los ápices de piña empleados. Esto se manifiesta en los mayores valores de supervivencia a partir de los 180 min de aplicadas las soluciones vitrificadoras durante la deshidratación de los ápices. En el caso, de la supervivencia de los ápices criopreservados también los máximos niveles se alcanzan con la solución vitrificadora PVS3.

Lo anterior pudiera tener su explicación en que la solución PVS2 utiliza al compuesto químico dimetilsulfóxido que debe ser muy bien investigado su empleo porque tiene efectos fisiológicos y mutagénicos negativos para algunos materiales vegetales.

Los resultados negativos de tolerancia coinciden con lo informado para otros sistemas biológicos y está asociado al alto grado de toxicidad del dimetilsulfóxido (9) accesiones, se puede apreciar que el material vegetal mantuvo un porcentaje de supervivencia entre 6,3 -65 %.

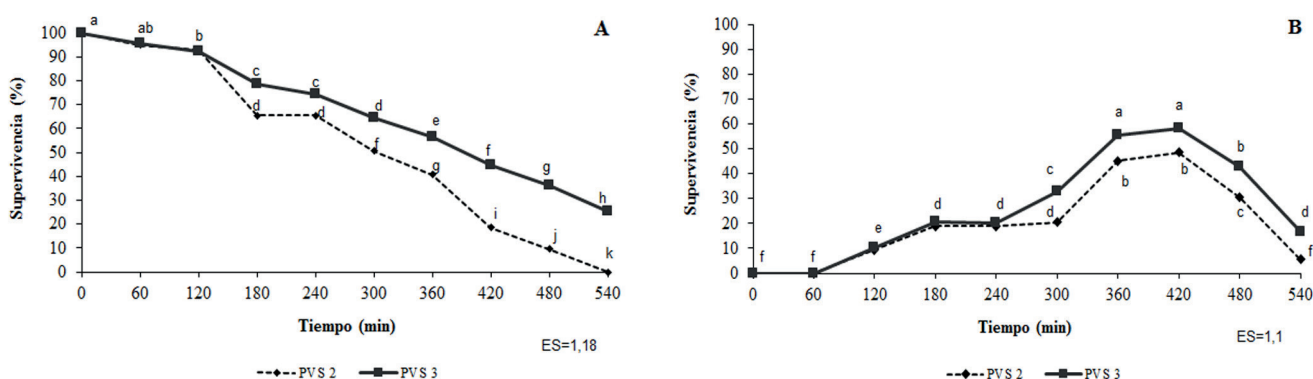
Con relación a lo anterior, en la Tabla II se puede apreciar la aplicación de la estrategia criogénica a nueve accesiones del banco de germoplasma *in vitro*, donde se pudo comprobar la respuesta variada de los diferentes genotipos en la supervivencia después de la criopreservación. El material vegetal durante el proceso de criopreservación puede sufrir varios estreses entre los que se encuentran cambios de pH, cambios mecánicos, deshidratación (daños osmóticos), daños en la rehidratación, estrés oxidativo y estrés por bajas temperaturas (30). Los porcentajes de supervivencia alcanzados por los ápices de piña criopreservados pudrían estar influenciados por alguno de estos estreses.

<sup>A</sup> Thinh, N. T. Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral Paper, Kobe University, Faculty of Agriculture, Japan, 1997.



A: antes de la inmersión en nitrógeno líquido B: posterior a la inmersión en nitrógeno líquido  
 Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ )  
 Los datos se transformaron para el análisis según  $x' = 2 \arcsen ((x/100)0,5)$

**Figura 7. Efecto del tiempo de deshidratación en PVS2 en la supervivencia de los ápices (según la temperatura de aplicación de la solución vitrificadora)**



A: antes de la inmersión en nitrógeno líquido B: posterior a la inmersión en nitrógeno líquido  
 Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey,  $p < 0,05$ )  
 Los datos se transformaron para el análisis según  $x' = 2 \arcsen ((x/100)0,5)$

**Figura 8. Efecto del tiempo de deshidratación en la supervivencia de los ápices (según la solución vitrificadora empleada)**

**Tabla II. Porcentaje de supervivencia que se obtuvo con la aplicación del procedimiento de crioconservación por vitrificación en nueve accesiones del banco *in vitro* de germoplasma de piña**

Cultivar	Supervivencia (%)	
	No Crioconservar	Crioconservado
Cabezona	61,5	27,9
Española Roja P3R5	53,1	20,0
Española Roja del Caney	45,5	12,1
Cayena lisa Serrana	50,3	25,3
MD2	80,1	60,2
Cayena de Puerto Rico	80,2	65,5
Perolera	49,9	33,8
Piña blanca	57,9	24,7
Piñuela Karata	33,1	6,3



## CONCLUSIONES

Se determinaron diferentes aspectos técnicos de una estrategia criogénica para aumentar los niveles de supervivencia de los ápices a la inmersión en nitrógeno líquido. Estos fueron: tipo de ápice compuesto por 3-4 primordios foliares con un tamaño aproximado 2.5-3 mm; precultivo en 0,3 mol L<sup>-1</sup> de sacarosa; aplicación de la solución de carga 0,4 mol L<sup>-1</sup> sacarosa +2 mol L<sup>-1</sup> de glicerol; temperatura de aplicación de la solución vitrificadora PVS3 a 0 °C durante 420 min. Mientras que en la visualización de los cambios estructurales ocurridos en los ápices crioconservados se observó que las células meristemáticas presentes en el domo apical y los primordios foliares en formación, sufrieron pocas alteraciones celulares y mantuvieron casi intactas sus características morfo-fisiológicas en las mejores condiciones de supervivencia. Se aplicó de manera exitosa un procedimiento de vitrificación para 9 accesiones del banco de germoplasma *in vitro* del Centro de Bioplantas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez, R.; Villalobo, A.; Pino, Y.; Concepción, O.; Martínez, E.; González, J. y Santos, R. "Rapid Introduction of 'MD-2' Pineapple Using Micropropagation". *Pineapple News*, no. 19, 2012, p. 24.
- Cerda, R. N. V. "Competitividad y Acceso Al Mercado Centroamericano De Piña Producida en Nicaragua". *REICE: Revista Electrónica de Investigación en Ciencias Económicas*, vol. 2, no. 3, 27 de agosto de 2014, pp. 188-207, ISSN 2308-782X, DOI 10.5377/reice.v2i3.1455.
- Villalobo, A.; González, J.; Santos, R. y Rodríguez, R. "Morpho-physiological changes in pineapple plantlets (*Ananas comosus* (L.) Merr.) during acclimatization". *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 36, no. 6, diciembre de 2012, pp. 624-630, ISSN 1413-7054, DOI 10.1590/S1413-70542012000600004.
- Martinez-Montero, M. E. y Harding, K. "Cryobionomics: Evaluating the Concept in Plant Cryopreservation" [en línea]. En: eds. Barh D., Khan M. S., y Davies E., *PlantOmics: The Omics of Plant Science*, edit. Springer India, 2015, pp. 655-682, ISBN 978-81-322-2171-5, DOI: 10.1007/978-81-322-2172-2\_23, [Consultado: 30 de enero de 2016], Disponible en: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-2172-2\\_23](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-2172-2_23)>.
- Engelmann, F. "Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 47, no. 1, 3 de noviembre de 2010, pp. 5-16, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources*. edit. Food & Agriculture Organization, 2006, 208 p., ISBN 978-92-5-105480-2.
- Martinez-Montero, M. E.; Martinez, J. y Engelmann, F. "Cryopreservation of Sugarcane Somatic Embryos". *Cryoletters*, vol. 29, no. 3, 1 de mayo de 2008, pp. 229-242, ISSN 0143-2044.
- Raven, P. H.; Guerrant, E. O.; Havens, K. y Maunder, M. *Ex situ Plant Conservation: Supporting Species Survival In The Wild*. edit. Island Press, 22 de febrero de 2013, 536 p., ISBN 978-1-59726-756-4.
- Raven, P. y Havens, K. "Ex Situ Plant Conservation and Cryopreservation: Breakthroughs in Tropical Plant Conservation". *International Journal of Plant Sciences*, vol. 175, no. 1, 2014, pp. 1-2, ISSN 1058-5893, DOI 10.1086/674030.
- Benson, E. E.; Betsou, F.; Fuller, B. J.; Harding, K. y Kofanova, O. "Translating Cryobiology Principles into Trans-Disciplinary Storage Guidelines for Biorepositories and Biobanks: A Concept Paper". *Cryoletters*, vol. 34, no. 3, 1 de mayo de 2013, pp. 277-312, ISSN 0143-2044.
- Vendrame, W.; Faria, R. T. de; Sorace, M. y Sahyun, S. A. "Orchid cryopreservation". *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 38, no. 3, junio de 2014, pp. 213-229, ISSN 1413-7054, DOI 10.1590/S1413-70542014000300001.
- Matsumoto, T.; Yamamoto, S.; Fukui, K.; Rafique, T.; Engelmann, F. y Niino, T. "Cryopreservation of Persimmon Shoot Tips from Dormant Buds Using the D Cryo-plate Technique". *The Horticulture Journal*, vol. Advance Publication, 2015, ISSN 2189-0110, 2189-0102, DOI 10.2503/hortj.MI-043.
- Berjak, P.; Bartels, P.; Benson, E. E.; Harding, K.; Mycock, D. J.; Pammenter, N. W.; Sershen y Wesley-Smith, J. "Cryoconservation of South African plant genetic diversity". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 47, no. 1, 26 de octubre de 2010, pp. 65-81, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/s11627-010-9317-4.
- Marco, M. A. y Serrano, M. F. "Crioconservación: herramienta para la conservación *ex situ* de material vegetal". *Cuadernos de Biodiversidad*, no. 38, 2012, pp. 9-12, ISSN 1575-5495, 2254-612X, DOI 10.14198/cdbio.2012.38.03.
- González, A. M. T. y Engelmann, F. *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. edit. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, C.R., 2013, 204 p., ISBN 978-92-9248-446-0.
- Morris, G. J. y Acton, E. "Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review". *Cryobiology*, vol. 66, no. 2, abril de 2013, pp. 85-92, ISSN 0011-2240, DOI 10.1016/j.cryobiol.2012.11.007.
- Gonzalez-Amao, M. T.; Marquez, R. M.; Villavicencio, C. U.; Martinez, M. M. E. y Engelmann, F. "Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification" [en línea]. En: eds. Engelmann F. y Takagi H., *Cryopreservation of tropical plant germplasm : current research progress and application*, (ser. JIRCAS International Agriculture Series, no. ser. 8), edit. IPGRI, Rome, 2000, pp. 390-392, ISBN 978-92-9043-428-3, Centre IRD de Bondy, [Consultado: 1 de febrero de 2016], Disponible en: <<http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010023396>>.

18. Gámez-Pastrana, R.; Martínez-Ocampo, Y.; Beristain, C. I. y González-Arnao, M. T. "An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification". *Cryoletters*, vol. 25, no. 6, 1 de noviembre de 2004, pp. 405-414, ISSN 0143-2044.
19. Hu, W.-H.; Liu, S.-F. y Liaw, S.-I. "Long-term Preconditioning of Plantlets: a Practical Method for Enhancing Survival of Pineapple (*Ananas Comosus* (L.) Merr.) Shoot Tips Cryopreserved Using Vitrification". *Cryoletters*, vol. 36, no. 4, 1 de julio de 2015, pp. 226-236, ISSN 0143-2044.
20. Souza, F. V. D.; Kaya, E.; Vieira, L. de J.; Souza, E. H. de; Amorim, V. B. de O.; Skogerboe, D.; Matsumoto, T.; Alves, A. A. C.; Ledo, C. A. da S. y Jenderek, M. M. "Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 124, no. 2, 31 de octubre de 2015, pp. 351-360, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1007/s11240-015-0899-8.
21. Daquinta, M. y Benegas, R. "Brief review of tissue culture of pineapple". *Pineapple News*, vol. 3, no. 7, 1997.
22. Murashige, T. y Skoog, F. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, 1 de julio de 1962, pp. 473-497, ISSN 1399-3054, DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
23. Martínez-Montero, M. E.; Engelmann, F. y Añaño, M. T. G. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm with Vegetative Propagation - Review of Sugarcane (Saccharum spp.) and Pineapple (Ananas Comosus (L.) Merrill) Cases*. edit. INTECH Open Access Publisher, 2012, 396 p., ISBN 978-953-51-0302-8.
24. Johansen, D. A. *Plant Microtechnique*. edit. McGraw-Hill, 1940, 544 p.
25. *IBM SPSS Statistics* [en línea]. versión 20, [Windows], edit. IBM Corporation, U.S, 2011, Disponible en: <<http://www.ibm.com>>.
26. Panis, B. "Cryopreservation of Monocots" [en línea]. En: ed. Reed B. M., *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, edit. Springer New York, 2008, pp. 241-280, ISBN 978-0-387-72275-7, DOI: 10.1007/978-0-387-72276-4\_11, [Consultado: 1 de febrero de 2016], Disponible en: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72276-4\\_11](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72276-4_11)>.
27. de los Ángeles, T. M.; Román, M. I.; González, C.; Manzano, A. R. y Mayor, Z. F. "Evaluación fenotípica y bioquímica de plantas regeneradas de meristemas proliferantes crioconservados de plátano (*Musa spp.*)". *Agrotecnia de Cuba*, vol. 35, no. 1, 2011, pp. 1-11, ISSN 2079-3472, 0568-3114.
28. Turner, S. R.; Senaratna, T.; Bunn, E.; Tan, B.; Dixon, K. W. y Touchell, D. H. "Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol". *Annals of Botany*, vol. 87, no. 3, 2001, pp. 371-378, ISSN 1095-8290, 0305-7364.
29. Takagi, H. "Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species". En: *Proceedings of an international workshop*, edit. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Tsukuba, Japan, 2000, pp. 178-193, ISBN 92-9043-428-7, CABDirect2, JIRCAS International Agriculture Series No.8.
30. Kaczmarczyk, A.; Menon, A.; Al-Hanbali, A.; Funnekotter, B.; Bunn, E.; Phang, P. Y. y Mancera, R. L. *Current Issues in Plant Cryopreservation*. edit. INTECH Open Access Publisher, 2012, book p., ISBN 978-953-51-0191-8.

Recibido: 15 de mayo de 2015

Aceptado: 28 de enero de 2016

## NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado  
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

### Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial

# TUTORIAL

## NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado  
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

*El Centro de Bioplantitas es una institución de investigaciones científicas, adscrita a la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez” del Ministerio de Educación Superior de Cuba. El mismo surge en 1987 como un laboratorio de investigaciones y micropropagación de plantas frutales. Desde 1992, tiene como misión desarrollar, aplicar y ofrecer tecnologías, productos, asistencia técnica y servicios académicos de excelencia en el marco de la Biotecnología Vegetal.*

*El grupo de investigadores, técnicos de laboratorio y otro personal auxiliar altamente calificados, han sido galardonados con premios relevantes de la Academia de las Ciencias de Cuba y con reconocimientos por la labor que realizan en la transferencia de resultados científicos y tecnológicos, la producción de vitroplantitas para el comercio internacional, y la educación postgraduada. Para el trabajo científico cuenta con seis laboratorios: Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, Agrobiología, Interacción Planta-Patógeno, Ingeniería Metabólica, Mejoramiento Genético de Plantas y Computación Aplicada. Todos con las mejores facilidades y un equipamiento de alta calidad para asegurar resultados relevantes.*

*El Centro de Bioplantitas desde 1997 y, como bienal, desarrolla su Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg), el cual constituye un marco excepcional para el intercambio de conocimientos y experiencias entre científicos, docentes y productores. En este se debaten en forma de Conferencia Magistrales, Talleres y Mesas Redondas durante sesiones de trabajo, los resultados más relevantes y los problemas más acuciantes que enfrenta la biotecnología vegetal cubana y mundial.*

*Por todo lo anterior, el Comité Organizador de BioVeg2015 en su décima edición se complace en presentarles una muestra representativa de 19 trabajos científicos completos recibidos y siente profunda satisfacción en invitarlos para el próximo BioVeg2017 que se desarrollará en la fecha 22-26 del mes de mayo.*

---

### Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial