

CRIOCONSERVACION DE MERISTEMOS APICALES DE PLANTAS *in vitro* DE CAÑA DE AZUCAR MEDIANTE EL METODO DE ENCAPSULACION/DESHIDRATAACION.

María T. González-Arno¹, Florent Engelmann², Caridad Urra¹ y Paul Lynch³.

¹Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Laboratorio de Criobiología y Liofilización, Apartado 6990, Habana, Cuba. ²ORSTOM, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, Francia. ³University of Nottingham, University Park, NG7 2RD, Nottingham, UK.

Recibido en enero de 1993. Aprobado en septiembre de 1993

Key words: Cryopreservation, apical meristem, sugarcane, encapsulation/dehydration method.

SUMMARY

Apical meristems of 3 sugarcane varieties (B 34104, C 8751, C 26670), sampled on *in vitro* plants could withstand freezing in liquid nitrogen (-196°C) using the encapsulation/dehydration technique based on the synthetic seed technology.

After dissection, meristems encapsulated in beads with Murashige-Skoog modified medium and 3% alginate were dehydrated by the pregrowth in liquid medium with high sucrose concentration (0.75 M) for 24 h and the exposition in the air current of the laminar flow (4 h). Freezing was performed rapidly by direct immersion in liquid nitrogen or slowly using programmable freezer. Survival of frozen meristems ranged between 26-100%, depending on the variety and on the experimental conditions. A progressive increase of sucrose concentration in the pregrowth treatment led to a drastic drop in the survival.

RESUMEN

Mediante el método de encapsulación/deshidratación, basado en la tecnología de la semilla artificial, fue posible conservar en nitrógeno líquido (-196°C) ápices de 3 variedades de plantas *in vitro* de caña de azúcar (B 34104, C 8751, C 26670) y lograr su regeneración posterior. Los meristemas encapsulados en medio de nutrientes Murashige-Skoog modificado conteniendo alginato al 3% se sometieron a un proceso de deshidratación mediante el precultivo en medio líquido a altas concentraciones de sacarosa (0.75 M), 24 h y el secado bajo el aire estéril en un gabinete de flujo laminar (4h). La congelación se realizó de forma rápida por la inmersión directa en nitrógeno líquido o en forma lenta, utilizando un congelador programable. La sobrevivencia de los meristemas crioconservados osciló entre el 26 y 100%, en dependencia de la variedad y las condiciones experimentales. Un aumento progresivo en la concentración de sacarosa, repercutió en la caída drástica de los resultados.

INTRODUCCION

La conservación de germoplasma de caña de azúcar se realiza tradicionalmente en forma de colecciones en campo. Sin embargo, esto demanda grandes costos laborales, de mantenimiento y

tierras, además de que las plantas están expuestas en condiciones naturales al ataque de plagas y patógenos y a las pérdidas por inclemencias ambientales.

En Estados Unidos por ejemplo, se han reportado pérdidas equivalentes a un 61% de los clones pertenecientes a la colección entre 1957 y 1977 (Berding y Roach, 1987). Las colecciones *in vitro* han sido desarrolladas para un gran número de especies, lo cual permite reducir estos problemas (Engelmann, 1991). Sin embargo, mantener grandes colecciones *in vitro* es cuestión de tiempo y riesgos de pérdidas por contaminación, además del peligro de variación somaclonal inducido por el cultivo de tejidos en largos períodos (Withers, 1987).

Sólo la crioconservación (almacenamiento en nitrógeno líquido, -196°C), ofrece la posibilidad en el presente, de conservar el material biológico por períodos teóricamente ilimitados. La crioconservación se ha aplicado a más de 70 especies vegetales (Dereuddre y Engelmann, 1987), de las cuales 40 son de origen tropical (Engelmann, 1991). En caña de azúcar, si bien esta técnica se ha utilizado con éxito por varios autores, sólo ha sido para conservar suspensiones celulares (Ulrich *et al.*, 1984; Bajaj *et al.*, 1987; Ling *et al.*, 1987; Gnanapragasam y Vasil, 1990) y callos embriogénicos (Ulrich *et al.*, 1984; Eksomtramage *et al.*, 1992). En meristemas apicales tejido de mayor interés por su fácil reproducción *in vitro*, su estabilidad genética y su estado fitosanitario libre de virus, el primer intento lo realizaron Bajaj *et al.* (1987), pero

sólo obtuvieron una pobre recuperación en forma de callos sin que fuera posible regenerar plantas después del almacenamiento.

Una nueva técnica de encapsulación/deshidratación (Fabre *et al.*, 1990) se ha venido adaptando con éxito para la crioconservación de meristemos y embriones somáticos. Mayormente se ha aplicado en cultivos provenientes de países con climas templados (Dereuddre *et al.*, 1992) y en una especie de origen tropical (Benson *et al.*, 1992).

El presente trabajo tuvo como objetivo lograr la crioconservación de ápices de plantas *in vitro* de caña de azúcar, estudiando diferentes parámetros del método de encapsulación/deshidratación en 3 variedades.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron plantas *in vitro* de las variedades Barbados 34104, C 8751 y C 26670, subcultivadas mensualmente¹. Los meristemos apicales se explantaron con una altura inicial de 0,5 mm a los 15 días posteriores al último pase.

El explante del ápice se realizó bajo un estéreo-microscopio en un gabinete de flujo laminar y los mismos se cultivaron durante 24 h en placas Petri sobre un medio sólido Murashige y Skoog modificado (Murashige y Skoog, 1962) conteniendo sacarosa 20 g/l, kinetina 0,1 mg/l, benzilaminopurina (BAP) 0,5 mg/l (medio T) y suplementado con carbón activado 2 g/l (González-Arno, 1989).

Para la crioconservación los ápices se sumergieron en medio T líquido, pero carente de calcio y de carbón activado, conteniendo alginato de sodio al 3%. Los ápices en alginato se gotearon sobre el medio líquido suplementado con 0,1 M de cloruro de calcio, para provocar la polimerización del alginato y la formación de las cápsulas con los ápices en su interior. Estas cápsulas se pasaron para erlenmeyers con el medio T líquido a diferentes concentraciones de sacarosa (0,3-1 M) y se colocaron en una zaranda orbital durante 24 h.

Después del precultivo, las cápsulas se secaron superficialmente con papel de filtro y se deshidrataron bajo la incidencia directa del aire estéril del flujo laminar por 4 h. Para determinar el tiempo de deshidratación en flujo laminar, se utilizaron cápsulas vacías tratadas previamente durante 24 h en medio de cultivo conteniendo 0,75 M de sacarosa. El proceso se extendió desde 0 a 12 h y el contenido de humedad se calculó en base al peso seco.

Las cápsulas deshidratadas se pasaron a criotubos y se realizó la congelación de forma rápida por la inmersión directa y lenta en nitrógeno líquido, a una velocidad de 1°C/min utilizando un congelador programable marca FTS System Biocool.

La descongelación del tejido después del almacenamiento a -196°C durante 1 h, se ejecutó de forma lenta y las muestras se pasaron para el medio de recuperación (medio T + carbón activado), para ser cultivadas durante 1 semana en la oscuridad con el posterior pase a la luz.

La efectividad del método se midió por la sobrevivencia del tejido encapsulado después de 5 semanas de cultivo. Las plantas regeneradas de los ápices crioconservados se propagaron para su posterior pase a tierra.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos después de la crioconservación de los ápices de caña de azúcar se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1.
Efecto del precultivo en sacarosa y de los métodos de congelación en la sobrevivencia de los ápices.

Variedad	Precultivo (24 horas)	SOBREVIVENCIA (%) Método de Congelación	
		Rápido	Programado
B 34104	0.50 M	59	81
	0.75 M	26	100
C 26670	0.50 M	100	93
	0.75 M	100	100
C 8751	0.50 M	0	0
	0.75 M	67	67

Nota: Enfriamiento hasta -40°C a 1°C/min. e inmersión posterior en nitrógeno líquido.

Se puede apreciar que se obtuvo sobrevivencia después de la congelación para las 3 variedades estudiadas, en un rango entre 26-100%. El trabajo conjunto con la ORSTOM de Montpellier en el marco del Proyecto FAO (TCP/CUB/0056) permitió comparar estos resultados con los obtenidos para otras 4 variedades utilizando el método de encapsulación/deshidratación (38-91% de sobrevivencia)².

En cuanto a las condiciones de precultivo en sacarosa, sólo los tratamientos directos en 0,5 y 0,75 M garantizaron resultados positivos después de la congelación. Esto puede ser debido tanto a diferencias en la velocidad del mecanismo de deshidratación osmótica, como al contenido final de agua en las cápsulas, así como al intercambio de este azúcar entre el medio y el tejido. Es de señalar, que concentraciones inferiores a 0,5 M no provocaron un nivel de deshidratación adecuado, mientras que superiores a 0,75 M fueron tóxicas.

El aumento progresivo de la concentración de sacarosa tampoco incremento los resultados y por el contrario,

1 Korneva *et al.*, 1984, Comunicación personal.

2 Paulet *et al.*, 1992, resultados no publicados.

repercutió en la caída drástica de la sobrevivencia aún en el rango de concentración más favorable (Tabla 2).

Tabla 2

Efecto del aumento progresivo de la concentración de sacarosa en el precultivo y de los métodos de congelación

Variedad	Precultivo	SOBREVIVENCIA (%) Método de congelación	
		Rápido	Programado
B 34104	A	0	0
	B	0	0
	C	0	17
C 26670	A	0	0
	B	0	10
	C	0	14
C 8751	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0

A: 0.3 M (24 h) + 0.5 M (24 h). B: 0.5 M (24 h) + 0.75 M (24 h).
C: 0.3 M (24 h) + 0.5 M (24 h) + 0.75 M (24 h)

Los métodos de congelación estudiados no tuvieron una influencia marcada en la sobrevivencia del material biológico crioconservado, por lo que la inmersión directa en nitrógeno líquido podría ser una variante más económica y sencilla.

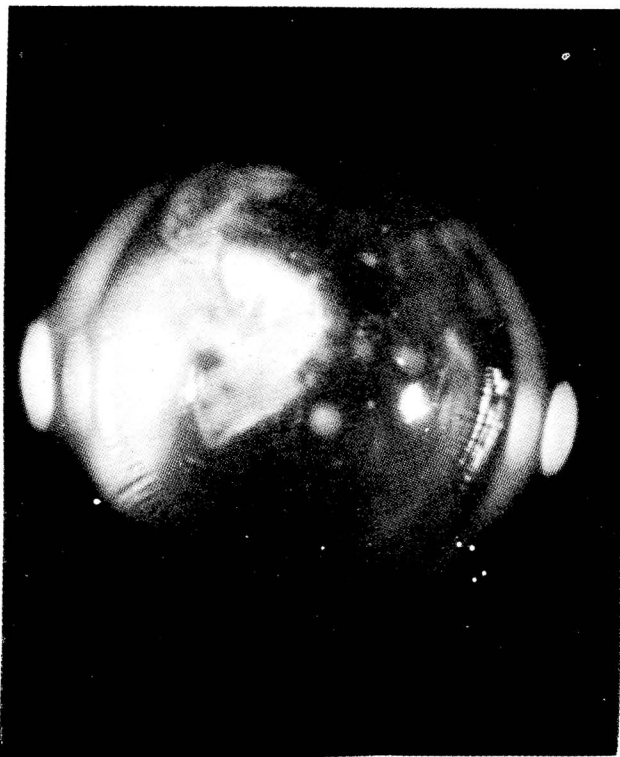


Fig. 1. Apice de una planta *in vitro* (0.5 mm), encapsulado.

Los ápices que sobrevivieron a la crioconservación se transformaron posteriormente en plantas vigorosas, que se han podido propagar con facilidad y constituyen una segunda generación de plantas *in vitro* ya que provienen de ápices crioconservados.

En la figura 1 se muestra el ápice de una planta *in vitro* (0.5 mm), recién explantado y encapsulado.

La figura 2 refleja la regeneración del ápice después de la crioconservación.

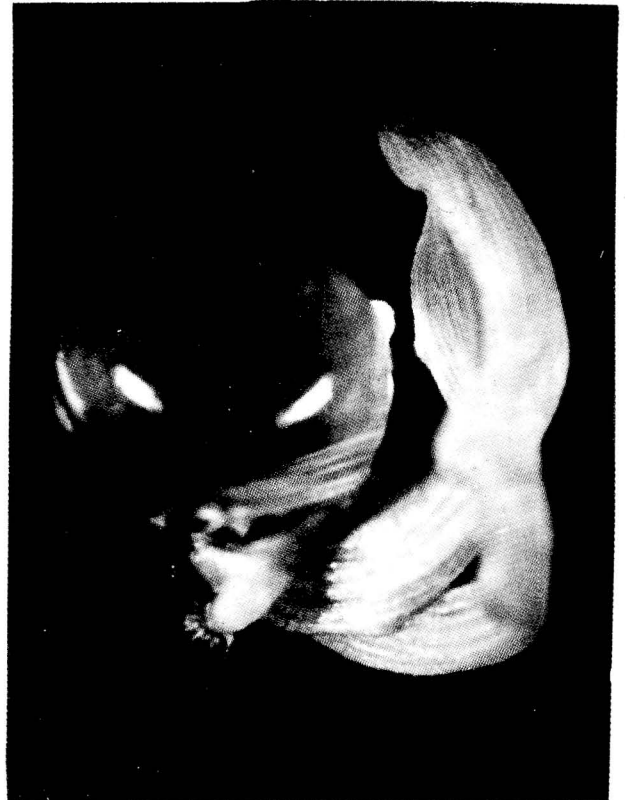


Fig. 2. Apice en regeneración después de la crioconservación.

CONCLUSIONES

Fue posible lograr la crioconservación y la regeneración posterior en plantas, de ápices de caña de azúcar *in vitro* utilizando el método de encapsulación/deshidratación.

Es conveniente optimizar las condiciones de recuperación, fundamentalmente en lo referente a los medios de cultivo, con vistas a elevar la sobrevivencia del tejido de diferentes variedades, después de la congelación. Tales experiencias se han confirmado por algunos autores en otras especies (embriones somáticos de palma de aceite, Engelmann, 1988; meristemos de yuca, Benson *et al.*, 1992).

Este trabajo ha servido para introducir una tecnología de avanzada, brindando aportes en materia

de crioconservación de ápices. En un futuro, puede hacerse extensiva a otras especies y formas de cultivo *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y especialmente a su sede en Cuba, por el apoyo brindado en el desarrollo del trabajo.

REFERENCIAS

- BAJAJ, Y.P.S.; S. KORNEVA; R. GUTIERREZ y R. MARIBONA (1987). Freeze preservation of plantlets, excised meristems and cell cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) at -196°C. In: *Proc. Int. Conf. of Cryogenics*. Ed. A. Bose y P. Sengupta. McGraw-Hill, New Delhi, 222-226.
- BENSON, E.E.; N. CHABRILLANGE y F. ENGELMANN (1992). In: *Proc. Soc. for Low Temp. Biol. Autumn Meeting*, Stirling, UK. (en impresión)
- BERDING, N. y B. T. ROACH (1987). Germplasm collection, maintenance and use. In: *Sugarcane improvement through breeding*. Eds. D. J. Heinz. Elsevier, Amsterdam. 143-210.
- DEREUDDRE, J. y F. ENGELMANN (1987). The use of cryopreservation for setting up banks of plant germplasm. In: *Proc. Coll. Franco-Britannique IAPTC*, Angers, France, 8-9 Oct., 48-78.
- DEREUDDRE, J. (1992). *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Eds. Y. Dattee, C Dumas and A. Gallais. Springer Verlag, Berlin, 297.
- EKSOMTRAMAGE, T.; F. PAULET; E. GUIDERDONI; J.C. GLASZMANN and F. ENGELMANN (1992). Development of cryopreservation process for embryogenic calli of a commercial hybrid of sugarcane (*Saccharum* sp.) and application to different varieties. *Cryo-letters* 13:239-252.
- ENGELMANN, F. (1988). Cryopreservation of oil palm somatic embryos: Importance of the freezing process. *Cryo-letters* 9:220-235.
- ENGELMANN, F. (1991). In vitro conservation of tropical germplasm. *Euphytica* 57:227-243.
- FABRE, J. y J. DEREUDDRE (1990). Encapsulation dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips. *Cryo-letters* 11:413-426.
- GNANAPRAGASAM S. y K. I. VASIL (1990). Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Rep.* 9:419-423.
- GONZALEZ-ARNO, M. T., N. D. DONEST y S. POPOV (1989). Cultivo de meristemos apicales de caña de azúcar de tamaño mínimo. *Ciencias Biológicas* (en impresión).
- LING C. J., L. S. DE y H. S. LONG (1987). Sugarcane callus cryopreservation. In: *Plant Biology. Plant Cold Hardiness*, Ed. P. H. Li, Alan R. Liss Inc., New York, vol. 5:323-337.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG (1962). A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- ULRICH, J. M.; B. FINKLE y P.H. MOORE (1984). Frozen preservation of cultured sugarcane cells. *Sugarcane* 3:11-14.
- WITHERS, L. A. (1987). Long-term preservation of plant cells, tissues and organs. *Oxford Survey of Plant Molecular and cell biology* 4:221-272.