

Metodología para la crioconservación de callos con estructuras embriogénicas en el cultivo de la caña de azúcar

✉ Marcos Martínez-Montero¹, José C Lorenzo¹, Eulalia Ojeda², Janet Quiñones¹, Néstor Mora⁴, Margelis Sánchez³, Alitza Iglesias¹, Julia Martínez¹, Ramiro Castillo³

¹Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). Laboratorio de Mejoramiento Genético, Carretera a Morón Km 9, Ciego de Ávila, CP 69 450
E-mail: marcossem@bioplantas.cu

²Estación Provincial de Investigaciones en la caña de azúcar, EPICA, Ciego de Ávila

³Universidad Ciego de Ávila (UNICA)

⁴Instituto Finlay, Ciudad de La Habana

RESUMEN

En la actualidad, la única solución para evitar la pérdida de tiempo del potencial embriogénico de los callos con estructuras embriogénicas en la caña de azúcar es la crioconservación. Sin embargo, para ello es necesario vencer algunos retos tecnológicos y su validación, para establecer una metodología, los que constituyen objetivos de este trabajo. Los resultados más importantes se relacionan con el desarrollo de una metodología de crioconservación, mediante un procedimiento simple de enfriamiento lento para preservar callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas. Esto permite mantener su capacidad regenerativa en el tiempo avalado por evaluaciones en condiciones *ex vitro* de plantas de caña de azúcar regeneradas a partir de callos crioconservados, que no variaron fenotípicamente cuando se compararon con los controles sin crioconservar luego de un riguroso ensayo durante 27 meses. Estos estudios contribuyen al desarrollo del conocimiento científico, porque por primera vez se realiza una evaluación detallada sobre el efecto del almacenamiento criogénico a largo plazo en la supervivencia y regeneración de plantas de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas. Para el cultivo de la caña de azúcar se realizaron determinaciones de los productos de la peroxidación lipídica y se demostró la importancia de implicación de los radicales libres y el estrés oxidativo como indicadores de los daños inducidos por la crioconservación. Estos resultados son fundamentales en las tecnologías desarrolladas, cuya eficiencia se ha basado en el empleo de estos materiales para la producción a gran escala de vitroplantas.

Introducción

El nombre científico de la caña de azúcar es (*Saccharum* spp. Híbrido), el cual se utiliza para designar a los Híbridos interespecíficos del género *Saccharum*. Los cruces genéticos se realizan, fundamentalmente, entre híbridos de *S. officinarum* L. y otras formas e híbridos comerciales [1]. La caña de azúcar posee mecanismos fisiológicos para la producción y acumulación de sacarosa en el tallo y para la obtención de biomasa. Sin embargo, el hombre ha realizado trabajos para lograr la mejoría genética, es decir, obtener nuevos somaclones o cultivares que aprovechen la luz, los nutrientes y el agua con más eficiencia. Alrededor de 120 países en el mundo producen azúcar, y el 63% de la producción total se obtiene del cultivo de la caña de azúcar [2].

En Cuba existen condiciones favorables para el desarrollo de la caña de azúcar, y constituye uno de los principales productos que aportan ingresos a su economía. En la actualidad, ocupa aproximadamente 650 000 ha, lo que representa cerca del 15% del área cultivada total del país [3].

La agricultura cañera mundial está afectada porque, la propagación vegetativa del cultivo debe renovarse en el campo en períodos entre uno y cinco años [4]. Este proceso lleva numerosos problemas: el costo de su mantenimiento es elevado, es tedioso y consume mucho tiempo. Además, si la calidad de la semilla es baja, disminuyen los rendimientos y las labores se intensifican. El cultivo se expone a los riesgos de los desastres naturales, a la transmisión sistémica de enfermedades, a la selección natural y al ataque de plagas [2]. Por todo ello, es necesario aplicar las técnicas de cultivo *in vitro* en la caña de azúcar.

En general, las técnicas de cultivo *in vitro* se emplean para el mantenimiento, producción o modificación del material vegetal. Estas se pueden dividir como técnicas de cultivo de tejidos indiferenciados y diferenciados [5]. Los cultivos indiferenciados son los callos y las suspensiones celulares, y se utilizan ampliamente para propósitos comerciales, así como para investigaciones moleculares y celulares [6].

El cultivo *in vitro* de callos de caña de azúcar es muy importante. En Cuba se utilizan callos con estructuras embriogénicas como material inicial para lograr la regeneración indirecta de plantas por diferentes estrategias, las cuales constituyen una alternativa para el incremento de la eficiencia y la proliferación de la especie [7-10]. Además, se realizan investigaciones valiosas para la selección de variedades resistentes a factores bióticos [11], factores abióticos [12] y para los esquemas de transformación genética [13].

Sin embargo, en cualquier protocolo de cultivo *in vitro* a largo plazo, el empleo de callos implica riesgos como: la pérdida del potencial regenerativo, de su naturaleza embriogénica, elevados costos por subcultivos continuos, la pérdida de productos por enfermedades, por errores técnicos y humanos; además, en ocasiones se requiere de una colección pública accesible [2, 4, 6]. Por lo tanto, es necesario el almacenamiento de los callos con una adecuada supervivencia, en condiciones seguras y características embriogénicas apropiadas.

Hasta la fecha, la mejor opción para disminuir estos riesgos es la crioconservación. Esta se considera una

1. Daniels J, Roach B. Taxonomy and evolution. En: DJ Heinz (ed.). *Sugarcane Improvement through breeding*. Elsevier 1987:7-84.
2. Taylor PWJ. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation V*. YPS Bajaj (ed.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, 1997;39:256-71.
3. FAO. FAOSTAT Database Results. Disponible en: <http://apps1.fao.org/faostat/servlet.htm> (consulta septiembre 20, 2004)
4. Guiderdoni E, Mérot B, Eksomtramage T, Paulet F, Feldmann P, Glaszmann JC. Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum*, Species). En: YPS Bajaj (ed.). *Biotechnology in Somatic Embryogenesis Agriculture and Forestry, Synthetic Seed II*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995; 31:92-113.
5. Ashmore SE. Status reports on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia, 1997:67.
6. Reinhold PJ, Van Iren F, Kijne JW. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. En: Engelmann F, Takagi H (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma, Italia, 2000:91-102.
7. Jiménez E. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV, Fac. de Ciencias Agropecuarias, UCLV. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba, 1995:100.

técnica de conservación *in vitro* a largo plazo, ya que permite el almacenamiento a temperaturas ultrabajas, preferiblemente la del nitrógeno líquido (-196 °C). A estas temperaturas, la velocidad de las reacciones químicas y biofísicas es tan lenta que no ocurren deterioros biológicos [14].

Además, con estas técnicas, los materiales vegetales se preservan en espacios reducidos, protegidos de la contaminación y sin muchos labores de mantenimiento, solo se debe controlar el nivel del nitrógeno líquido en los termos de almacenamiento [15]. Sin embargo, para que el material vegetal sea crioconservado, sus células deben superar momentos estresantes, como la exposición a las bajas temperaturas, la formación de cristales de hielo y la deshidratación severa [6].

Según Jian y cols., Eksomtramage y cols. y Gnanapragasam y Vasil, se ha tenido éxito con los callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas [16-18]. Todas las metodologías han seguido la estrategia definida como deshidratación por congelación extracelular, la cual emplea un régimen de enfriamiento controlado [19]. Sin embargo, su validación se limita en los laboratorios que no sean especializados en crioconservación, porque se requiere un equipo de congelación programable, que es costoso y en ocasiones bastante complejo [5, 20, 21].

Adicionalmente, en los protocolos antes mencionados se ha investigado la crioconservación de callos de caña de azúcar, obtenidos de segmentos de hojas inmaduras de plantas cultivadas *in vitro*. Esta tiene como limitación la baja capacidad morfológica de estos callos, asociada a este tipo de explante [22]. En las gramíneas se ha reconocido a los embriones inmaduros y las inflorescencias jóvenes, como los explantes fisiológicamente más adecuados en la retención de la capacidad embriogénica [23]. Es por ello que algunas tecnologías para la propagación masiva de plantas de la caña de azúcar utilizan las inflorescencias inmaduras como explante inicial del proceso [8], con el inconveniente de que este tipo de estructura no está disponible todo el año y en algunos genotipos aparece bajo determinadas condiciones ambientales.

A partir de estas investigaciones, el presente artículo muestra los resultados de un estudio para establecer una metodología para la crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas con el uso de inflorescencias inmaduras. En esta metodología se evaluaron los porcentajes de supervivencia y la regeneración de plantas (plantas por 500 mg de callos) en condiciones *in vitro* para: a) tres variedades: CP52-43, C1051-73, C91-301; b) explantes procedentes de inflorescencias inmaduras, y explantes procedentes de hojas inmaduras de plantas *in vitro*; c) hasta 16 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido para la variedad CP52-43.

Para emplear la crioconservación como una herramienta adicional en alguna estrategia biotecnológica, es esencial validar que la metodología desarrollada no provoca un efecto desestabilizador. En las investigaciones con callos de caña de azúcar crioconservados, anteriores a las nuestras, no existían estudios relacionados con la determinación de algunos cambios bioquímicos irreversibles que pudieran provocar la crioconservación en las membranas celulares, ni existían datos acerca del comportamiento,

en condiciones de campo, de plantas de caña de azúcar a partir de callos crioconservados, para conocer si las metodologías propuestas afectaban los indicadores fisiológicos y los rendimientos agrícola y agroindustrial. En ese sentido, en este trabajo también se muestran los resultados sobre la evolución de la pérdida de electrolitos, productos de peroxidación lipídica y contenido de proteínas de las membranas celulares durante cinco días después de la crioconservación. Además, se determina el comportamiento *ex vitro* de las plantas regeneradas a partir de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas crioconservados, teniendo en cuenta caracteres agronómicos, tales como indicadores fisiológicos, rendimientos agrícola y agroindustrial.

Materiales y métodos

Generalidades de los experimentos y procesamiento de los datos

Los experimentos *in vitro* se realizaron en el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila y los experimentos de campo, en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de esa provincia. Para la realización de los diferentes experimentos se siguieron las siguientes etapas:

Selección de las plantas de caña de azúcar de un banco donante

Las plantas de caña de azúcar se seleccionaron del banco donante de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Ciego de Ávila. El genotipo principal que se utilizó en este estudio fue CP52-43 (CP43-64 x CP38-34). Para la validación de la metodología se utilizaron las variedades C91-301 (C1616-75 x POJ 2878) y C1051-73 (B42231 x C431-62), tomadas del Bloque de Hibridaciones del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Sancti Spiritus.

Formación de callos

Los experimentos principales se realizaron con callos procedentes de inflorescencias inmaduras. Primero, se colectaron las inflorescencias inmaduras de plantas adultas, entre 9 y 12 meses. Luego, se desinfectaron las inflorescencias y se enjuagaron, tal como enuncia Jiménez [7]. Finalmente, se seleccionaron los segmentos de inflorescencias inmaduras entre 3.0 y 5.0 mm de longitud, se cultivaron en placas de Petri (90 mm diámetro) sobre el medio de Murashige y Skoog [24], con 3.0 mg·L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético [8, 25]. Esto se mantuvo en la oscuridad a 25 ± 2 °C durante 30 días. Además, para el experimento de validación de la metodología se utilizaron callos con estructuras embriogénicas procedentes de hojas inmaduras de plantas cultivadas *in vitro*, siguiendo el método descrito por Jiménez [7].

Mantenimiento de los callos

Los callos formados se transfirieron hacia el medio de proliferación de Murashige y Skoog [24], con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1.0 mg·L⁻¹), arginina (50.0 mg·L⁻¹) y prolina (500.0 mg·L⁻¹). Esta etapa se realizó en la oscuridad a 25 ± 2 °C durante 30 días [25].

8. Castillo R. La embriogénesis somática en la caña de azúcar *Saccharum sp.* híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis de Doctorado, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, Cuba, 2001:105.

9. Freire M. Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar *Saccharum spp.* híbrido var. C87-51) empleando medios de cultivos líquidos. Tesis Doctorado, Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba, 2001:106.

10. Nieves N, Martínez-Montero ME, Castillo R, Blanco MA, González-Olmedo JL. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2001;65:15-21.

11. Pérez JN, Jiménez EA, Gómez R. Mejora genética de la caña de azúcar mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro*. En: A Arencibia, MT Cornide (eds). Biodiversidad y Biotecnología de la Caña de Azúcar. Cuba: Elfos Scientiae 1999: 79-92.

12. Díaz P. Utilización de la variación somaclonal para la tolerancia a la salinidad de la caña de azúcar. En: A Arencibia, MT Cornide (eds.). Biodiversidad y Biotecnología de la Caña de Azúcar. Cuba: Elfos Scientiae 1999:93-105.

13. Arencibia A. Métodos de transformación genética de la caña de azúcar. En: A Arencibia, MT Cornide (eds.). Biodiversidad y Biotecnología de la Caña de Azúcar. Cuba: Elfos Scientiae 1999:107-24.

14. Withers LA, Engelmann F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. En: A Altman (ed.). *Biotechnology in Agriculture*, Marcel Dekker Inc., New York, 1997:57-88.

15. Sakai A. Development of cryopreservation techniques. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japón / IPGRI, Roma, Italia, 2000:1-7.

16. Jian LC, Sun DL, Sun LH. Sugarcane callus cryopreservation. En: PH Li (ed.). *Plant cold hardiness*. Alan R. Liss, Inc. New York, 1987:323-37.

17. Eksomtramage T, Paulet F, Guiderdoni E, Glaszmann JC, Engelmann F. Development of a cryopreservation process for embryogenic calluses of a commercial hybrid of sugarcane (*Saccharum sp.*) and application to different varieties. *Cryo-Letters*, 1992;13:239-52.

18. Gnanapragasam S, Vasil IK. Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science* 1992;83:205-15.

19. Withers LA, King PJ. A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *Cryo-Letters* 1980; 1:213-20.

20. Benson EE, Lynch PT, Stacey GN. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. *AgBiotech News and Information* 1998;10(5):133-42.

21. Reed BM. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-Letters* 2001;22:97-104.

Selección de callos con estructuras embriogénicas

Después de mantenerse se seleccionaron los callos sobre el medio de proliferación durante 30 días (dos meses de formados). Los callos tenían las siguientes características morfológicas: compactos, nodulares y de color blanco-amarillo, según observaciones de Castillo [8], conformados por estructuras globulares y con predominio de células meristemáticas redondeadas, citoplasma denso con pequeñas vacuolas. Para esta selección, se realizaron cortes a los callos y se observaron al estereomicroscopio para desechar las partes que no tenían estructuras embriogénicas. Se utilizaron callos con estructuras embriogénicas de aproximadamente 5 mm de diámetro.

Tratamiento estadístico de los datos

Todos los experimentos de laboratorio se realizaron con tres repeticiones y se aplicó un diseño completamente aleatorio. Para los estudios de cultivo en condiciones *ex vitro*, se siguió el diseño de bloques al azar con seis réplicas. En el procesamiento de los datos se empleó el programa de computación Statistical Package for Social Sciences (SPSS para Windows, versión 8.0, Copyright SPSS Inc., 1989-1997). Se comprobó la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba Levene. Se realizaron pruebas paramétricas (t-test, ANOVA, Tukey). Se trabajó siempre con un valor de probabilidad de error tipo I de $p < 0.05$. Los datos se transformaron para el análisis del porcentaje de supervivencia según $\bar{x} = 2 \arcsin[(x/100)^{0.5}]$; y el número de plantas regeneradas, de acuerdo con $\bar{x} = (0.5 + x)^{0.5}$.

Metodología para la crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas

Selección del procedimiento simple de enfriamiento

Teniendo como precedente los trabajos de Maddox y cols. y Withers [26, 27], quienes utilizaron con éxito procedimientos simples de enfriamiento para suspensiones celulares de *Nicotiana* y *Musa*, respectivamente, se evaluó la posibilidad de utilizar uno de estos procedimientos para reemplazar los que hasta la fecha se habían utilizado para crioconservar callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas (velocidad controlada mediante un congelador programable acoplado a una computadora).

Considerando los resultados preliminares del autor, así como los obtenidos por Jian y cols. y Eksomtramage y cols. [16, 17], se tomaron callos con estructuras embriogénicas, seleccionados previamente, y se transfirieron hacia placas de Petri con medio de proliferación fresco, con papel de filtro en su superficie. Después de 10 días en el medio de proliferación (tiempo post-subcultivo), los callos pasaron a las etapas y condiciones siguientes:

Etapa I. Tratamiento crioprotector con sacarosa. Los callos se colocaron en crioviales de polipropileno (volumen del criovial: 2.0 mL; número de callos/criovial: 8; masa fresca promedio del callo: 40 mg, que se replicó cinco veces). Los crioviales con las muestras se pasaron a un baño de hielo para adicionarles 1.0 mL de medio

de cultivo con $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa a igual temperatura. El tratamiento duró 60 min.

Etapa II. Tratamiento crioprotector con dimetilsulfóxido. A los crioviales con las muestras y la sacarosa se les adicionó dimetilsulfóxido puro ($14 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) hasta que alcanzó la concentración final de 5% (v/v) en la solución. El dimetilsulfóxido se adicionó progresivamente durante los primeros 30 min del tratamiento crioprotector, cuya duración fue de 60 min.

Etapa III. Procedimiento de enfriamiento. Aunque en esta etapa lo más importante es seleccionar el procedimiento de enfriamiento, también es necesario conocer la temperatura para la siembra de los cristales de hielo en el medio crioprotector y el efecto del tiempo de inducción de los cristales de hielo extracelulares.

Temperatura para la siembra de los cristales de hielo en el medio crioprotector

Se realizó un control de la temperatura en el tiempo, utilizando un termómetro digital con un termopar de cobre-constantán acoplado (Figura 1a). Se determinó el punto de subenfriamiento y la temperatura de congelación en equilibrio de diferentes mezclas crioprotectoras de sacarosa contenidas en los crioviales, los cuales se encontraban en un baño de etanol (95%) preenfriado (0°C) y colocados, a su vez, en un congelador a -40°C (Figura 1b). La siembra de los primeros cristales de hielo en el medio extracelular se llevó a cabo sumergiendo instantáneamente la base de los crioviales en nitrógeno líquido (Figura 1c). Esto se realizó a -8°C antes de que se alcanzara la temperatura de congelación en equilibrio durante el tiempo de inducción (2.5 s).

Efecto del procedimiento simple de enfriamiento y tipo de alcohol

Los crioviales con callos crioprotectados pasaron al procedimiento de enfriamiento, para el cual se seleccionó una de las alternativas siguientes:

a) En un recipiente con un baño de alcohol (isopropanol) preenfriado a 0°C , en el que se transfirieron a un congelador de laboratorio a -40°C y se les redujo aún más la temperatura [27].

b) En los orificios de una caja de poli-estireno, la cual se situó también en un congelador a -40°C [26].

Además, se comprobó la posibilidad de sustituir el tipo de alcohol utilizado en el baño preenfriado como en el primer procedimiento (a). Ello tuvo como

22. Krishnaraj S, Vasil IK. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: TA Thorpe (ed.). *In vitro* embryogenesis in plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers 1995;20:417-69.

23. Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed.). *In vitro* embryogenesis in plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers 1995;20:155-204.

24. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 1992;15:473-97.

25. Blanco MA, Nieves N, Sánchez M, Borroto CG, Castillo R. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1997;51:153-8.

26. Maddox AD, Gonsalves F, Shields R. Successful preservation of suspension cultures of three *Nicotiana* species at the temperature of liquid nitrogen. *Plant Science Letters* 1983;28:157-62.

27. Withers LA. Cryopreservation of cultures plant cells and protoplasts. En: KK Kartha (ed.). *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Boca Raton 1985:243-67.

28. Panis B, Totte N, Van Nimmen K, Withers LA, Swennen R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Science*, 1996;121:95-106.

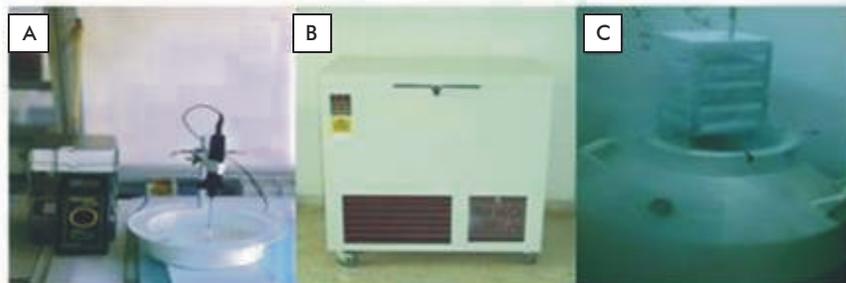


Figura 1. Aditamentos utilizados para el desarrollo del procedimiento simple de congelación: a) baño de alcohol y termómetro digital con termopar de cobre-constantán acoplado, sumergido en un criovial; b) congelador de laboratorio a -40°C ; c) tanque con nitrógeno líquido para la inmersión y el almacenamiento de los crioviales.

precedente lo informado por Panis *et al.* [28], quienes sustituyeron el iso-propanol por el metanol para generalizar las investigaciones de crioconservación en sus condiciones de trabajo. En este estudio se empleó el etanol 95% (v/v) producido en Cuba. Por ende, se colocaron los callos crioprotegidos en un baño de alcohol (isopropanol, metanol o etanol) preenfriado a 0 °C, en el que se transfirieron a un congelador de laboratorio a -40 °C.

Efecto del tiempo de inducción de los cristales de hielo extracelulares

Por último, una vez que se seleccionó el procedimiento simple de enfriamiento y por su importancia en la estrategia de deshidratación por congelación extracelular, también en esta etapa III, se precisó el efecto de la siembra de los cristales de hielo en la supervivencia y regeneración de plantas de callos crioconservados. Ello se ensayó durante diferentes tiempos de inducción (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 s).

En esta etapa III se determinó la velocidad de enfriamiento al medir el tiempo transcurrido desde que los viales control (que contenían la mezcla crioprotectora) con una temperatura de 0 °C alcanzaron la temperatura de -40 °C. La velocidad promedio de enfriamiento, que se determinó desde 0 hasta -40 °C, fue bastante estable y se logró una velocidad de 0.5 °C·min⁻¹, la cual se encuentra en el rango de las velocidades catalogadas como lenta, según Engelmann [29].

Etapa IV. Precongelación. Cuando se alcanzó -40 °C en la solución crioprotectora de los crioviales, las muestras se mantuvieron a esta temperatura en el baño de alcohol durante 1 h (tiempo en el original), antes de la inmersión directa en nitrógeno líquido.

Etapa V. Almacenamiento. Las muestras permanecieron en nitrógeno líquido durante 2 h.

Etapa VI. Descongelación rápida. Para la descongelación de las muestras, los crioviales se sumergieron en baño de María a +40 °C con agitación constante durante aproximadamente 2 min.

Etapa VII. Recuperación. Los callos descongelados se colocaron sobre un papel de filtro en la superficie del medio de cultivo de proliferación, para favorecer la difusión y eliminación progresiva de los crioprotectores [medio de Murashige y Skoog [24], con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1.0 mg·L⁻¹), arginina (50.0 mg·L⁻¹) y prolina (500.0 mg·L⁻¹), contenido en placas, de Petri (60 mm de diámetro y 30 mL de medio por placa) que se situaron posteriormente en la oscuridad.

Etapa VIII. Evaluación de la supervivencia. Como criterio de supervivencia se consideró el número de callos que mostró síntomas de recrecimiento a los 30 días de la recuperación, cuando se observaron al estereomicroscopio y se midió su tamaño. Los resultados se expresaron en porcentajes con respecto al total de callos usados por tratamiento.

Etapa IX. Evaluación de la regeneración de plantas. A los 30 días de recuperación se seleccionaron callos al azar hasta conformar 500 mg de masa fresca por frascos de cultivo (altura: 120 mm; diámetro: 70 mm; 25 mL de medio por frasco). Los callos se transfirieron a un nuevo medio para inducir la regeneración de plantas (medio de proliferación pero desprovisto de ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Se empleó un régimen

de 16 h luz/8 h oscuridad, con un flujo de fotones fotosintéticos activos de 40 μmol·m⁻²·s⁻¹. Al cabo de 80 días, se evaluó la regeneración según Eksomtramage [17] contando todas las plantas regeneradas con una altura igual o mayor que 10 cm, las cuales se transfirieron posteriormente a condiciones de cultivo *ex vitro*.

Efecto del tiempo post-subcultivo en la supervivencia y regeneración de plantas a partir de callos crioconservados

Con el objetivo de estudiar el efecto del estado fisiológico de los callos en la supervivencia y regeneración de plantas del material crioconservado, se seleccionaron callos con estructuras embriogénicas, y se depositaron en placas de Petri con medio fresco de proliferación con papel de filtro en su superficie. Después de los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días como tiempo post-subcultivo en el medio de proliferación, los callos permanecieron en las mismas condiciones descritas para la crioconservación y en la etapa III se emplearon los mejores resultados del procedimiento de enfriamiento.

Por otra parte, como no existen precedentes sobre el estado de crecimiento de los callos de caña de azúcar, obtenidos a partir de inflorescencias inmaduras antes de iniciar la crioconservación y por su importancia en el éxito de la supervivencia a la temperatura del nitrógeno líquido [15], se seleccionaron callos con estructuras embriogénicas y se depositaron en placas de Petri con medio fresco de proliferación con papel de filtro en su superficie. Se empleó un lote de callos (cinco grupos) con una masa fresca inicial de 400 mg por cada placa de Petri, que se replicó tres veces por tratamiento. Se determinó la masa fresca de los callos a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días como tiempo post-subcultivo mediante el peso de los callos sobre papel de filtro Whatman No. 1, cuya masa es conocida.

Efecto de la concentración de sacarosa del medio crioprotector en la supervivencia y regeneración de plantas a partir de callos crioconservados

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sacarosa en la supervivencia y regeneración de plantas del material crioconservado, se seleccionaron callos con estructuras embriogénicas y se depositaron en placas de Petri con medio fresco de proliferación con papel de filtro en su superficie. Después del mejor tiempo post-subcultivo en el medio de proliferación, los callos siguieron las mismas condiciones descritas para la crioconservación y se emplearon en la etapa III los mejores resultados del procedimiento de enfriamiento comentadas anteriormente, excepto en la etapa I, que se emplearon diferentes concentraciones de sacarosa (0.0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 mol·L⁻¹) en el medio crioprotector.

Por otra parte, se seleccionaron callos con estructuras embriogénicas y se sometieron a 15 días como tiempo post-subcultivo. Con posterioridad, los callos se colocaron en crioviales de polipropileno (volumen del criovial: 2.0 mL; número de callos/criovial: 8; masa fresca promedio del callo: 40 mg, que se replicó cinco veces). A su vez, los crioviales con las muestras se pasaron a un baño de hielo y se les adicionaron 1.0 mL de

29. Engelmann F. *In vitro* conservation methods. En: JA Callow, BV Ford-Lloyd, HJ Newbury (eds.). *Biotechnology and Plant Genetic Resources*, CAB International 1997;119-61.

medio de cultivo con sacarosa (0.0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 mol·L⁻¹) enfriado previamente en hielo. Al final, se determinó la tolerancia de los callos durante 60 min, a las concentraciones de sacarosa según la evaluación de la supervivencia y del número de plantas regeneradas de la forma indicada antes.

Efecto de la concentración de dimetilsulfóxido del medio crioprotector en la supervivencia y regeneración de plantas a partir de callos crioprotectados

Con el objetivo de estudiar el efecto del dimetilsulfóxido en la supervivencia y regeneración de plantas del material crioprotectado, se utilizaron callos con estructuras embriogénicas seleccionados previamente y se transfirieron hacia placas de Petri con medio fresco de proliferación, que tenían un papel de filtro en su superficie. Después del mejor tiempo post-subcultivo en el medio de proliferación, los callos permanecieron en las mismas condiciones descritas para la crioprotectación y en la etapa III se emplearon los mejores resultados del procedimiento de enfriamiento descrito antes. En la etapa II, sin embargo, se emplearon diferentes concentraciones de dimetilsulfóxido (0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5% (v/v)) en el medio crioprotector. Además, en la etapa I se emplearon los mejores resultados de sacarosa del experimento anterior.

Por otra parte, se seleccionaron callos con estructuras embriogénicas y se sometieron a 15 días como tiempo post-subcultivo. Posteriormente, se colocaron en crioviales de polipropileno (volumen del criovial: 2.0 mL; número de callos/criovial: 8; masa fresca promedio del callo: 40 mg, que se replicó cinco veces). A su vez, a los crioviales con las muestras se les adicionó 1.0 mL de medio de cultivo previamente enfriado en hielo y se pasaron a un baño de hielo para adicionar, progresivamente, el dimetilsulfóxido puro (14 mol·L⁻¹), durante los primeros 30 min del tratamiento, hasta alcanzar la concentración final deseada en la solución (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 % (v/v)). Al final, se determinó la tolerancia de los callos durante 60 min a las concentraciones de dimetilsulfóxido, según el criterio de supervivencia descrito en el epígrafe acerca de la selección del procedimiento simple de enfriamiento.

Efecto del tiempo de pre congelación en la supervivencia y regeneración de plantas a partir de callos crioprotectados

Con el objetivo de estudiar el efecto del tiempo de pre congelación en la supervivencia y regeneración de plantas del material crioprotectado, se utilizaron callos con estructuras embriogénicas, seleccionados previamente, y se transfirieron hacia placas de Petri con medio fresco de proliferación, que tenían un papel de filtro en su superficie. Después del mejor tiempo post-subcultivo en el medio de proliferación, los callos permanecieron en iguales condiciones descritas para la crioprotectación y en la etapa III se emplearon los mejores resultados del procedimiento de enfriamiento seleccionado. Sin embargo, en la etapa I y en la etapa II, se emplearon los mejores resultados obtenidos para la sacarosa y el

dimetilsulfóxido, respectivamente. Además, en la etapa IV, se ensayaron diferentes tiempos de permanencia (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 h) a la temperatura de pre congelación (-40 °C).

Determinación analítica de algunos cambios que provoca la crioprotectación en las membranas celulares

Con el objetivo de evaluar los daños que provoca la crioprotectación en las membranas celulares, se realizaron las determinaciones analíticas de pérdida de electrolitos, el contenido de los productos de peroxidación lipídica y el contenido de proteínas en las membranas celulares. Estas se llevaron a cabo con muestras control de callos que no se sometieron al proceso de crioprotectación y con muestras de callos crioprotectados, de acuerdo con las diferentes etapas descritas antes pero con las siguientes condiciones:

Etapa I. Tratamiento crioprotector con 0.3 mol·L⁻¹ sacarosa.

Etapa II. Tratamiento crioprotector con 10% (v/v) dimetilsulfóxido.

Etapa III. Enfriamiento en un recipiente con un baño de alcohol (etanol 95% v/v) preenfriado a 0 °C, en el que se transfirieron a un congelador de laboratorio a -40 °C y se les redujo aún más la temperatura. La siembra de cristales de hielo se realizó a -8 °C durante 5 s.

Etapa IV. Pre congelación a (-40 °C) durante 2 h.

Etapa V. Almacenamiento de los crioviales en nitrógeno líquido (2 h).

Etapa VI. Descongelación rápida.

Las muestras para los diferentes ensayos se tomaron al cabo de 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 días durante el proceso de recuperación en el medio de proliferación a la oscuridad.

Pérdida de electrolitos

La pérdida de electrolitos se calculó según lo informado por Sun [30], pero con modificaciones. Las muestras de callos con una masa fresca de aproximadamente 500 mg, se transfirieron a vasos de precipitado (50 mL de capacidad) con 30 mL de agua bidestilada. Se realizó la medición de la conductividad del agua de imbibición de los callos a las 2 h y de la conductividad total de callos que hirvieron durante 10 min, y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El porcentaje de la pérdida de electrolitos se calculó de la manera siguiente:

$$\text{Porcentaje de pérdida de electrolitos} = \frac{\text{Conductividad del agua de imbibición a las 2 h} \cdot 100}{\text{Conductividad total}}$$

Preparación de la fracción microsomal para la determinación del contenido de los productos de la peroxidación lipídica y del contenido de proteínas

La preparación de la fracción para la determinación del contenido de los productos de la peroxidación lipídica y del contenido de proteínas se realizó según lo informado por Hurkman y Tanaka [31], pero con modificaciones. Los callos se trituraron en nitrógeno líquido hasta lograr un polvo fino. Este polvo (2.0 g) se homogenizó en frío con 20 mL de una solución en politrón. La composición de la solución de homogenización fue: 250 mmol·L⁻¹ de

30. Sun WQ. State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. *Cryobiology* 1999; 38:372-85.

31. Hurkman WJ, Tanaka CK. Solubilization of plant membrane protein for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* 1986;81:802-6

sacarosa; 100 mmol·L⁻¹ de NaCl; 1.0 mmol·L⁻¹ de ácido tetraacético dietilenoamino; 5.0 mmol·L⁻¹ de ácido ascórbico; polivinilpirrolidona (1.0% (m/v); masa molecular 24.500 Da); 2.0 mmol·L⁻¹ de ditiotreitól; 10.0 µg·mL⁻¹ de bacitracín ajustado a pH 7.2 con 10.0 mmol·L⁻¹ de Tris. Los extractos crudos se centrifugaron a 10 000 x g durante 20 min a 4 °C. Los desechos celulares, la fracción nuclear y las mitocondrias se sedimentaron. El sobrenadante se recentrifugó a 100 000 x g durante 1 h a 4 °C. La fracción microsomal en suspensión se recuperó del *pellet* y se disolvió con 150 mmol·L⁻¹ de KCl.

Determinación del contenido de los productos de la peroxidación lipídica

Una vez obtenida la fracción microsomal, se realizó la determinación del contenido de los productos de la peroxidación lipídica, según lo informado por Harding y Benson [32]. Una alícuota (5.0 mL) de ácido tricloroacético al 20% (v/v) con ácido tiobarbitúrico 0.5% (m/v) se adicionó a 0.5 mL de las membranas de la fracción microsomal en un tubo Eppendorf. Las muestras se agitaron y se incubaron en baño de María a 95 °C durante 30 min. Luego, los tubos se enfriaron en hielo durante 15 min; sus contenidos se transfirieron a una microcentrífuga, y se centrifugaron a 10 000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia no específica del producto de la reacción se midió a 600 nm y se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm, para las mediciones del malondialdehído [32], y a 455 nm para otros aldehídos [33].

Determinación del contenido de proteínas

La concentración de proteínas de la fracción de las membranas microsomales obtenidas se determinó por el método de Lowry y cols. [33], modificado por el empleo de desoxicolato de sodio. El suero de albúmina bovina (Sigma) se utilizó como estándar. Una alícuota con 20.0 µL de 5.0% (m/v) de desoxicolato de sodio se adicionó a 120.0 µL de la fracción de las membranas microsomales en tubos Eppendorf. A continuación, se adicionaron 60.0 µL NaOH (1.0 mol·L⁻¹), 800.0 µL del reactivo A (1.0% sulfato de cobre; 1.0% tartrato de potasio y sodio; 2.0% carbonato de sodio) a razón de un volumen 1:1:98 y 100 µL de reactivo de Folin diluido 1:2, respectivamente. La absorbancia se midió a 720 nm después de 30 min de la reacción.

Validación de la metodología de crioconservación según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido

Una vez acotadas cada una de las mejores condiciones de la metodología de crioconservación de los acápites anteriores, se realizó su validación, según el tiempo de almacenamiento de los callos en nitrógeno líquido (1, 4, 8, 12 y 16 meses). Además, durante los 16 meses se mantuvo el subcultivo mensual de los callos con estructuras embriogénicas en el medio de proliferación en la oscuridad. En ambos casos, se evaluó la supervivencia, el porcentaje de callos que regeneraron plantas y el número de plantas obtenidas a partir de 500.0 mg de masa fresca.

Validación de la metodología de crioconservación para callos de diferentes procedencias del explante y variedades

Después de determinadas cada una de las mejores condiciones de la metodología de crioconservación descritas anteriormente, se realizó su validación extrapolando las condiciones de trabajo:

a) Diferente procedencia del explante: para callos de la variedad CP52-43 procedentes de inflorescencias inmaduras y procedentes de hojas inmaduras de plantas cultivadas *in vitro*.

b) Diferentes variedades: se compararon callos crioconservados de los genotipos CP52-43, C91-301 y C1051-73.

En todos los casos se evaluó la supervivencia y el número de plantas regeneradas de la forma indicada antes en el acápite correspondiente.

Estudio del comportamiento *ex vitro* de las plantas regeneradas a partir de callos crioconservados (variedad CP52-43)

El experimento se llevó a cabo en las áreas de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Ciego de Ávila, sobre un suelo ferralítico rojo compactado y se sembró en abril de 1997. El diseño fue de bloques al azar, con seis réplicas por tratamiento, que tenían parcelas con 7.5 m de largo y 6.0 m de ancho cada una. En ellas se plantaron cinco surcos a una distancia de 1.5 m y una densidad de 15 plantas por surco (450 plantas por tratamiento en total). En los bordes se plantó la variedad C266-70 para que sirviera como barrera contra ciertas enfermedades y como efecto de borde. Se aplicó la fórmula completa en la plantación (75 kg·ha⁻¹ de nitrógeno; 50 kg·ha⁻¹ de P₂O₅ y 50 kg·ha⁻¹ de K₂O).

A las parcelas se les realizaron controles fitosanitarios de las enfermedades de primer orden de la caña de azúcar: el carbón (*Ustilago scitaminea* H. Sydow) y la roya (*Puccinia melanocephala* H. y P. Sydow = *Puccinia erianthi* Padwick y Khan). Para el carbón se determinó el índice de infección, según la fórmula: Índice de infección = (Tallos enfermos/Tallos sanos) * 100. Para la roya, el índice de infección se determinó según: Índice de infección = (Σ(a·b)/n·k) * 100, donde a = Número de plantas evaluadas, b = Grado promedio que se alcanzó de acuerdo con la escala de evaluación de la roya, n = total de plantas evaluadas, k = 4 (Grado máximo de la escala).

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: plantas regeneradas de callos crioconservados, plantas regeneradas de callos no crioconservados y plantas de propagación vegetativa. Cuando las vitroplantas alcanzaban una altura aproximada de 6.0 a 8.0 cm, se transfirieron para el área de aclimatización y se les aplicó el procedimiento recomendado por Rodríguez y cols. [35]. Al cabo de los 60 días, se transfirieron a condiciones de cultivo en campo para compararlas con el material de propagación vegetativa.

Las plantas de propagación vegetativa se obtuvieron según el procedimiento empleado en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Ciego de Ávila, a partir de yemas aisladas con una sierra de doble disco y se colocaron en un pregerminador rústico, tapadas con sacos de yute y nailon, para aumentar la temperatura, y

32. Harding K, Benson EE. Biochemical and molecular methods for assessing damage, recovery and stability in cryopreserved plant germplasm. En: BWW Grout (ed.). Genetic preservation of plant cells. Springer Verlag 1995:113-69.

33. Ait Barka E, Kalantari S, Makhlof J, Arul J. Effects of uv-c irradiation on lipid peroxidation markers during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Fruits. Aust. J Plant Physiol 2000;27:147-52.

34. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.

35. Rodríguez R, Escalona M, Rodríguez Y, Cid M, Pina D, González-Olmedo J. Aclimatización de plántulas de caña de azúcar provenientes de sistemas de inmersión temporal. Cultivos Tropicales 2000; 21(2).

posteriormente se mantuvieron en invernadero de 60 días antes de pasar al campo [37].

Las evaluaciones que se realizaron fueron:

1. Para la caña planta a los seis meses de inicio del experimento: se determinaron los indicadores fisiológicos. Se tomaron cinco plantas al azar, se les separaron las hojas y las vainas, y se determinó la longitud (en metros) y el diámetro de los tallos (en centímetros). Además, se contó la cantidad de tallos por metro lineal.

2. Para la caña planta a los doce meses de inicio del experimento: se seleccionaron al azar cuatro metros lineales por parcela (dos muestras de dos metros), se determinaron los indicadores fisiológicos (longitud (m), diámetro (cm) y cantidad de los tallos por metro lineal) y la masa fresca promedio de un tallo por parcela, la cual se expresó en kilogramos. También se calculó el rendimiento agrícola, expresado en toneladas por hectárea, mediante la multiplicación de la masa fresca promedio de un tallo por parcela por el número de tallos en una hectárea. Además, se determinaron los indicadores azucareros de la composición del jugo en los tallos, según la metodología recomendada por Spencer y Meade [37] para: Brix total (grados), polisacáridos en jugo o pol en jugo, pureza (%), fibra en caña (%) y polisacáridos en caña o pol en caña (%). Además se calculó el rendimiento agroindustrial, expresado en toneladas por hectárea, mediante la relación (pol en caña x masa fresca promedio de un tallo)/100 x número de tallos en una hectárea.

3. Para el primer retoño a los 15 meses de cortado: se realizaron las evaluaciones como en la caña planta a los 12 meses de inicio del experimento.

Resultados y discusión

Establecimiento de una metodología para la crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas, a partir de inflorescencias inmaduras mediante un procedimiento simple de enfriamiento

Selección del procedimiento simple de enfriamiento

Efecto del procedimiento simple de enfriamiento y tipo de alcohol

En la tabla 1 se comparan las diferencias entre la supervivencia de los callos después de la crioconservación, según el procedimiento de enfriamiento empleado. Los mejores resultados se corresponden con el baño de alcohol preenfriado. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los distintos agentes congelantes (etanol, metanol e isopropanol) (Tabla 2).

Tabla 1. Efecto del procedimiento de enfriamiento en la supervivencia de los callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas crioconservados, de la variedad CP52-43

Procedimiento de enfriamiento según:	Supervivencia (%)
Maddox [26]	5.5 b
Withers [27] con isopropanol	20.1 a

Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (t-test, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis según: $x' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$. Error típico = 0.89.

Tabla 2. Efecto del alcohol en la supervivencia de los callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas crioconservados, de la variedad CP52-43

Tipo de alcohol	Supervivencia (%)
Isopropanol	21.3
Metanol	22.6
Etanol (95%, v/v)	20.7

No hubo diferencias estadísticas significativas según ANOVA. Los datos se transformaron para el análisis según: $x' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$. Error típico = 0.95.

En el experimento hubo supervivencia después del empleo de nitrógeno líquido en los dos procedimientos de enfriamiento. Además, se pudo aplicar el etanol al 95% (v/v) sin dificultades, como sustituto de los agentes congelantes más utilizados según la literatura. Supuestamente, la supervivencia alcanzada significa que existió una deshidratación protectora que permitió la vitrificación en algunas células, sin que se formaran cristales de hielo dentro de las células. Desde el punto de vista práctico, la siembra de los cristales de hielo se dificultó en el procedimiento propuesto por Maddox y cols. [26]. Por los mayores valores de supervivencia, se propone para los experimentos siguientes emplear el procedimiento propuesto por Withers [27], con un baño de etanol preenfriado a 0 °C.

Efecto del tiempo de inducción de los cristales de hielo extracelulares

En la tabla 3 se expone el rango de tiempo de inducción evaluado. Resultó propicio establecer el nivel óptimo a los 5 s, con valores de supervivencia significativos y regeneración de plantas.

Cuando se realizó la siembra de los cristales de hielo durante 2.5 segundos, aparentemente no fue suficiente el tiempo de contacto de los viales con el nitrógeno líquido, para mantener la estabilidad de los primeros núcleos de hielo extracelulares formados. Estos pudieron desaparecer con rapidez al transferir los crioviales nuevamente al baño de alcohol. En

36. Espinosa A, Bombino P, Gómez J, Ojeda E. La propagación por yemas aisladas, una realidad en la agricultura cañera cubana. En: Libro de Resúmenes de Medio Siglo de Investigaciones Cañeras en Cuba, 1997:84.

37. Spencer LS, Meade GP. Manual del azúcar de caña. Segunda ed. La Habana: Instituto del libro 1974.

Tabla 3. Efecto del tiempo de inducción de los cristales de hielo extracelulares en la supervivencia y regeneración de plantas de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas crioconservados (variedad CP52-43)

Temperatura (°C)	Tiempo de inducción (s)	Supervivencia (%)	Regeneración (plantas por 500 mg de callos)
	0	0 d	0 d
	2.5	20.5 b	10.5 b
-8	5	35.5 a	30.5 a
	7.5	3.0 c	4.0 c
	10	0 d	0 d
	Error típico	0.320	1.35

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis del porcentaje de supervivencia según: $x' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$; y el número de plantas regeneradas, de acuerdo con $x = (0.5 + x)^{0.5}$.

cambio, 7.5 y 10 segundos causaron la congelación súbita de las muestras.

De manera general, poco se precisa sobre este importante paso, concerniente a los protocolos clásicos de criopreservación [38]. Por ejemplo, aunque Jian y cols. y Gnanaprasam y Vasil [16, 18], debieron realizar la siembra de los cristales de hielo para criopreservar callos de caña de azúcar, no lo describieron. Incluso, Eksomtramage y cols. [17], quienes mencionaron la necesidad de realizar este evento durante la congelación de callos de caña de azúcar, no indicaron detalles al respecto. Es decir, que no existían precedentes sobre el efecto de la siembra de los cristales de hielo dentro de un protocolo de criopreservación para callos de caña de azúcar anterior a estos estudios.

Los resultados tras la siembra extracelular de cristales de hielo a una temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, en la metodología de criopreservación, según la supervivencia y la regeneración de plantas, sugieren un tiempo de inducción de los cristales de hielo de 5 segundos para los siguientes experimentos. Sin embargo, los mayores niveles de supervivencia (aproximadamente 35%) son bajos cuando se comparan con el 90% de supervivencia obtenido por Jian y cols. y Eksomtramage y cols. [16, 17]. Todo ello demuestra que es necesario realizar ajustes a los diferentes factores involucrados, para el establecimiento y la validación de la metodología de criopreservación.

Efecto del tiempo post-subcultivo en la supervivencia y regeneración de plantas a partir de callos criopreservados

En la figura 2A se expone un efecto marcado del tiempo post-subcultivo en los niveles de supervivencia registrados. Los mayores valores se lograron entre 15 y 20 días, y no sobrepasaron el 50%, mientras que en la figura 2B se muestra su influencia en la regeneración de plantas a partir de los callos criopreservados, con un comportamiento similar en el tiempo evaluado.

Los resultados coinciden parcialmente con las evidencias de Jian y cols. [16], cuando criopreservaron callos de caña de azúcar obtenidos de plantas *in vitro*. Estos autores determinaron que la supervivencia durante la criopreservación está asociada con la selección en el período post-subcultivo, cuyos máximos valores se observan a los 10 días. Sin embargo, no lo relacionaron con el estado fisiológico

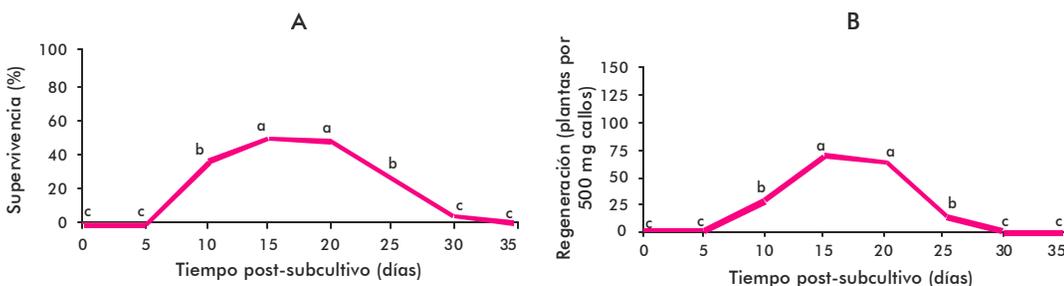


Figura 2. (A) Efecto del tiempo post-subcultivo en la supervivencia de los callos con estructuras embriónicas criopreservados de la variedad CP52-43. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis de la supervivencia según: $x' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$. Error típico = 0.221 y (B) Regeneración de los callos con estructuras embriónicas criopreservados de la variedad CP52-43. Los datos se transformaron para el análisis de la regeneración según: $x' = (0.5 + x)^{0.5}$. Error típico = 1.31.

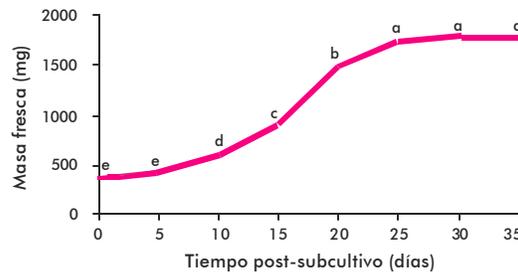


Figura 3. Efecto del tiempo post-subcultivo en la masa fresca de los callos de caña de azúcar con estructuras embriónicas de la variedad CP52-43 antes de la criopreservación. Valores de masa fresca con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Error típico = 4.51 mg.

en que se encontraban los callos antes de criopreservar.

En la figura 3 se muestra que existió una fase *lag* hasta el quinto día, después se inició un crecimiento prácticamente lineal de los callos hasta el día 25, con una velocidad promedio de 100 mg diarios. A partir del día 25 comenzó el estado estacionario y, en correspondencia, se incrementó la masa fresca.

Estos resultados constituyen la base de la selección del material que se ha de criopreservar, ya que varios autores han planteado la correlación que existe entre la fase de crecimiento activo del material y su respuesta ante la criopreservación de distintas especies [6, 27, 39]. Se ha estudiado que la morfología de las células en cultivo tiene un gran efecto en la criotolerancia. En la mayoría de las especies se ha demostrado que solamente las células pequeñas con alta densidad citoplasmática, que se encuentran en la periferia, formando pequeños agregados celulares, son las que sobreviven la criopreservación, y que las células grandes, vacuoladas, tienden a dañarse durante la congelación [27, 40]. Por ello, se sugiere que para los experimentos siguientes se deben estudiar los callos con 15 días de tiempo post-subcultivo.

Efecto de la concentración de sacarosa del medio crioprotector en la supervivencia y regeneración de plantas a partir de callos criopreservados (variedad CP52-43)

En la figura 4A se muestra que la concentración de sacarosa tuvo un efecto significativo en los niveles de supervivencia de los callos criopreservados. Los mejores

38. Panis B. Cryopreservation of banana (*Musa spp.*) germplasm. *Dissertationes de Agricultura* 272. Catholic University of Leuven, Bélgica, 1995:201.

39. Yoshida S, Hattanda Y, Suyama T. Variations in chilling sensitivity of suspension cultured cells of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) during the growth cycle. *Plant Cell Physiology* 1993;34:673-9.

40. Kristensen MMH, Find JI, Floto F, Moller JD, Norgaard JVN, Krogstrup P. The origin and development of somatic embryos following cryopreservation of an embryogenic suspension culture of *Picea sitchensis*. *Protoplasma* 1994;182: 65-70.

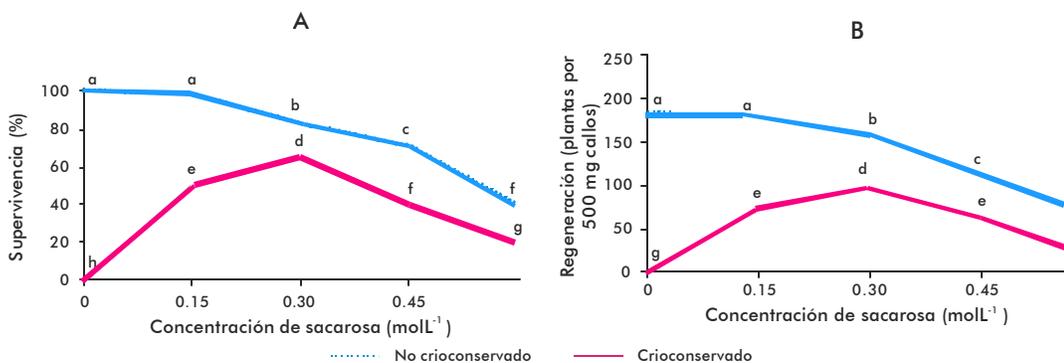


Figura 4. Efecto de la concentración de sacarosa durante la crioprotección en la supervivencia (A) y regeneración (B) de los callos con estructuras embriogénicas crioconservados y no crioconservados de la variedad CP52-43 (crioprotegidos solo con sacarosa). Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis de la supervivencia según: $x' = 2 \arcsin [(x/100)^{0.5}]$. Error típico = 0.210. Los datos se transformaron para el análisis de la regeneración según: $x' = (0.5 + x)^{0.5}$. Error típico = 1.28.

resultados, cercanos al 65%, se alcanzaron con el aumento de la concentración de sacarosa a 0.3 mol·L⁻¹, pero se redujo hasta el 20% para 0.60 mol·L⁻¹. En la figura 4B se expone cómo la concentración de sacarosa también tiene una influencia significativa en la regeneración de plantas de los callos crioconservados. Con el aumento de la concentración de sacarosa hasta 0.3 mol·L⁻¹, se incrementó el número de plantas regeneradas, el cual disminuyó posteriormente. La tolerancia de los callos a las concentraciones de sacarosa antes de crioconservar, provocó una disminución en la supervivencia y regeneración de plantas con el aumento de la concentración.

La importancia de la tolerancia a la sacarosa se debe a que esta, como otros carbohidratos, tiene una función importante en la regulación del potencial hídrico de las células [41], y en ocasiones se considera un inductor de la división celular y diferenciación [42]. Además, existen evidencias de que la función de la sacarosa es como señal en las plantas para modular la expresión de genes que codifican enzimas y proteínas transportadoras y de almacenamiento [43].

También mostraron una relación entre la vitrificación y la supervivencia de embriones somáticos de palma aceitera en nitrógeno líquido, por la reducción del contenido de agua congelable en las células. Ausborn y cols., Turner y cols. [44, 45], detectaron que la sacarosa desempeña una función estabilizadora en las bicapas lipídicas de las membranas, mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los azúcares libres y los lípidos. Niu y cols. [46] refieren que cuando la sacarosa penetra en las células en la cantidad adecuada, protege las enzimas de la toxicidad de los iones.

En la metodología de crioconservación, los resultados por efecto de la concentración de sacarosa según la supervivencia y regeneración de plantas, indican que la concentración de sacarosa a 0.30 mol·L⁻¹ es la que se deber usar para los siguientes experimentos.

Efecto de la concentración de dimetilsulfóxido del medio crioprotector en la supervivencia y regeneración de plantas a partir de callos crioconservados

En la figura 5A y en la figura 5B se representa la dependencia de la supervivencia y la regeneración de

plantas, respectivamente, para el material crioconservado a la concentración de dimetilsulfóxido. Los mejores resultados se alcanzaron con el 10% (v/v) de dimetilsulfóxido; sin embargo, disminuyeron al aumentar el dimetilsulfóxido en el medio crioprotector. Con respecto a la tolerancia de los callos sin crioconservar al dimetilsulfóxido, se observó que existe una disminución de la supervivencia y la regeneración de plantas con un aumento de la concentración de esta sustancia.

Según lo observado, los callos de caña de azúcar no sobrevivieron a la crioconservación cuando en la mezcla crioprotectora no estaba el dimetilsulfóxido, y la supervivencia y regeneración de plantas aumentó hasta el 10%. Sin embargo, supuestamente no existe una correspondencia entre el material crioconservado y el no crioconservado para concentraciones de dimetilsulfóxido iguales o mayores que el 10% (v/v), ya que los valores de supervivencia no tienen diferencias significativas en los tratamientos, e incluso la regeneración de plantas es superior para los callos crioconservados. Estos resultados coinciden con los de Finkle y cols. [47], para células de arroz, quienes concluyeron que el uso del dimetilsulfóxido es paradójico, porque aunque es tóxico, también inhibe el crecimiento de los cristales de hielo durante la crioconservación. ¿Cómo explicar los resultados?

Los resultados negativos de tolerancia coinciden con lo informado para otros sistemas biológicos y

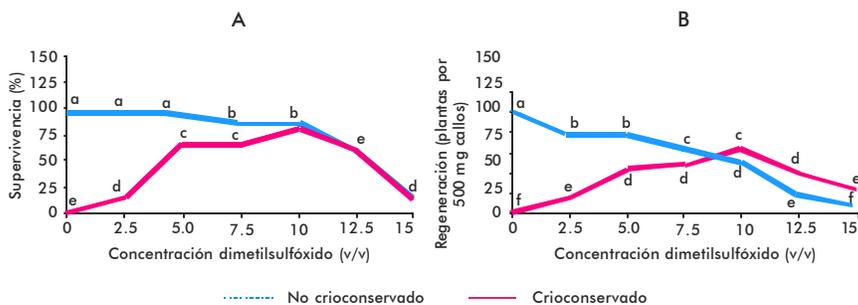


Figura 5. Efecto de la concentración de dimetilsulfóxido durante la crioprotección en la supervivencia (A) y regeneración (B) de los callos con estructuras embriogénicas crioconservados y no crioconservados (crioprotegidos solo con dimetilsulfóxido) de la variedad CP52-43. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis según $x' = 2 \arcsin [(x/100)^{0.5}]$. Error típico = 0.201.

41. Tetteroo FAA. Desiccation tolerance of somatic embryoids. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands, 1996.

42. Feher A, Pasternak TP, Dudits D. Transition of somatic cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2003;74:201-28.

43. Lunn JE, MacRae E. New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology* 2003;6:208-14.

44. Ausborn M, Schreier H, Brezesinski G, Fabian H, Meyer HW, Nuhn P. The protective effect of free and membrane bound cryoprotectants during freezing and freeze-drying of liposomes. *J Control Release* 1994;30:105-16.

45. Turner SR, Krauss SL, Bunn E, Senaratna T, Dixon KW, Tan B, Touchell DH. Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. *Plant Science* 2001; 161:1099-106.

46. Niu DK, Wang MG, Wang YF. Plant cellular osmotic. *Acta Biotheor* 1997;45: 161-9.

47. Finkle BJ, Zavala ME, Ulrich JM. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. En: KK Kartha (ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press. Boca Raton FL 1985:61-75.

están asociados con el elevado grado de toxicidad del dimetilsulfóxido [48, 49]. Kartha y cols. [50], detectaron la inhibición del crecimiento de cultivos embriogénicos de abeto blanco entre el 35 y el 42% a una concentración mayor del 5% (v/v) de dimetilsulfóxido. Klimaszewska y cols. [51] informaron una reducción del 28% del crecimiento de tejidos embriogénicos de abeto negro tratados con 15% (v/v) de dimetilsulfóxido. Estos últimos autores observaron al microscopio un fuerte efecto plasmolítico en las células, producido por el dimetilsulfóxido.

Sin embargo, a pesar de estos efectos negativos, los investigadores utilizan ampliamente el dimetil-sulfóxido para la protección de las células y de los tejidos vegetales a ultrabajas temperaturas. Según Engelmann [52], esta paradoja se asocia fundamentalmente con que el dimetilsulfóxido se debe añadir como componente de una mezcla crioprotectora y no de manera individual. Arakawa y cols. [48], evidenciaron que la toxicidad del dimetilsulfóxido en proteínas aisladas se debe a interacciones hidrofóbicas que se favorecen a altas temperaturas. En este sentido, el efecto tóxico del dimetilsulfóxido puede minimizarse cuando en precultivo se emplea la sacarosa a 0 °C, lo cual induce la biosíntesis de proteínas que neutralizan la acción tóxica del dimetilsulfóxido, asociado con los residuos de lisina [51, 53, 54].

Aunque el mecanismo de crioprotección del dimetilsulfóxido a las ultrabajas temperaturas no está claro aún, se reconoce que está relacionado con las propiedades coligativas de este compuesto penetrante; es decir, su acción directa con los cristales de hielo es la de disminuir el punto de congelación en equilibrio de la solución, según su concentración molar [55, 56]. Como agente penetrante en las células, evita una concentración excesiva de electrolitos tóxicos en la solución celular no-congelada [47].

Anchordoguy y cols. [53] sugieren, además, que el dimetilsulfóxido presenta un mecanismo noco-ligativo de protección, el cual involucra una interacción iónica entre su oxígeno y las bicapas de los fosfolípidos. Esto último contribuye a incrementar la estabilidad de las membranas durante la congelación-descongelación.

Los mejores resultados alcanzados en la regeneración de plantas para el material crioconservado con respecto al no crioconservado, pueden relacionarse con las evidencias encontradas por Aronen y cols. [57] para cultivos embriogénicos de *Abies cephalonica*. Estos autores demostraron que para cultivos crioprotectados con dimetilsulfóxido y crioconservados se eliminó una elevada proporción de células dañadas previamente por el dimetilsulfóxido, ya que solo las células pequeñas y meristemáticas sobrevivieron la inmersión en nitrógeno líquido. Sin embargo, para cultivos crioconservados se empleó una mezcla de crioprotectores que contenía dimetilsulfóxido, que minimizó los daños causados por este.

Por otra parte, se reconoce que en las plantas también ocurre el proceso fisiológico de muerte celular programada, como en los animales, lo que provoca la eliminación selectiva de las células no deseadas y su suicidio [58]. Según Joyce y cols. [59], diferentes tipos

de células vegetales sufren este proceso, entre ellas, las dañadas por el estrés *in vitro*, las cuales no funcionan adecuadamente. Sin embargo, el mecanismo de muerte celular programada en las plantas no está completamente elucidado, aunque se asocia con la acumulación de sustancias tóxicas sin su posterior conversión (*turn over*).

Los resultados por efecto de la concentración de dimetilsulfóxido en la metodología de crioconservación que se desarrolla y según los mayores tenores de supervivencia y regeneración de plantas, indican que la concentración del 10% (v/v) es la que se debe usar para los siguientes experimentos.

Efecto del tiempo de precongelación en la supervivencia y regeneración de plantas de caña de azúcar a partir de callos crioconservados (variedad CP52-43)

En la figura 6 se observó que las dos y tres horas (tiempo de permanencia) a la temperatura de precongelación (-40 °C), permitieron alcanzar los niveles más elevados de supervivencia (89%) y la regeneración de plantas fue de 147, sin diferencias significativas entre cada parámetro evaluado en ambos tiempos.

Al emplear el sistema simple de enfriamiento propuesto en estos estudios, se determinó que los callos de caña de azúcar aparentemente alcanzaron los niveles de deshidratación más apropiados cuando se mantuvieron por espacio de dos o tres horas a -40 °C. No se logró mejorar la supervivencia con tiempos de exposición superiores, lo cual probablemente se deba a que el material resulta muy deshidratado. Se estimó más conveniente realizar la precongelación a -40 °C durante dos horas para los siguientes pasos de la metodología de crioconservación que se ha de desarrollar.

A partir de estudios por espectroscopia de resonancia magnética nuclear en células de *Catharanthus roseus* [60], yemas vegetativas de manzana [61] y en diferentes tejidos de *Rhododendron japonicum* [62], se determinó que existe una gran dependencia entre la cantidad de agua que permanece dentro de las células y el tiempo de exposición a una temperatura de precongelación. Tyler y cols. [61] determinaron que al incrementar el tiempo de permanencia

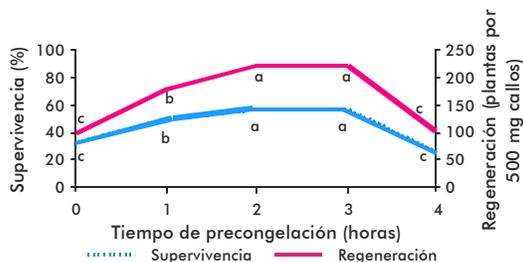


Figura 6. Efecto del tiempo de precongelación en la supervivencia y regeneración de los callos de caña de azúcar crioconservados de la variedad CP52-43. Para las medias de las líneas continuas y discontinuas independientes, las letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis de la supervivencia según: $x' = 2 \arcsin [(x/100)^{0.5}]$. Error típico = 0.215. Los datos se transformaron para el análisis de la regeneración según: $x' = (0.5 + x)^{0.5}$. Error típico = 1.29.

48. Arakawa T, Carpenter JF, Kita YA, Crowe JH. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: An hypothesis. *Cryo-biology* 1990;27:401-15.

49. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MSJ, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryo-biology* 1990;27:247-68.

50. Kartha KK, Fowke LC, Leung NL, Caswell KL, Hakman I. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol* 1988;132: 529-39.

51. Klimaszewska K, Ward C, Cheliak WM. Cryopreservation and plant regeneration from embryonic cultures of larch (*Larix x eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). *J Exp Botany* 1992;43:73-9.

52. Engelmann F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Engelmann F, Takagi H (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japan/IPGRI, Roma, Italia, 2000:8-20.

53. Anchordoguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH, Crowe LM. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulphoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology* 1991; 28:467-73.

54. Swan TW, O'Hare D, Gill RA, Lynch PT. Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspension cultures of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Cryo-Letters*, 1999;20:325-36.

55. McGann LE, Walterson ML. Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone. *Cryobiology* 1987;24:11-6.

56. Kinoshita K, Li SJ, Yamazaki M. The mechanism of the stabilization of the hexagonal II (HII) phase in PE membranes in the presence of low concentrations of dimethyl sulfoxide. *Eur Biophys J* 2001;30: 207-20.

57. Aronen TS, Krajinakova J, Haggman HM, Rynnänen LA. Genetic stability of cryopreserved embryonic clones of white spruce (*Picea glauca*). *Plant Cell Report* 1999;18:948-53.

a una temperatura negativa intermedia antes de la inmersión en nitrógeno líquido, se obtienen mejores resultados después de la crioconservación.

Los resultados de supervivencia logrados en este experimento son comparables con los mejores valores obtenidos por Jian y cols., Eksomtramage y cols. [16, 17]. Es decir, hasta este acápite queda establecida la metodología de crioconservación según los factores tomados en consideración.

Determinación analítica de algunos cambios que provoca la crioconservación en las membranas celulares

Es necesario señalar que en los experimentos se apreciaron diferencias significativas entre el material crioconservado y el control no crioconservado al analizar los valores de supervivencia y regeneración de plantas, aun en los mejores tratamientos. Estos resultados coinciden con los observados por Eksomtramage y cols. [17]. Sin embargo, para el cultivo de la caña de azúcar, hasta hoy no existen referencias sobre la determinación mediante técnicas analíticas de los posibles daños causados en las membranas por la crioconservación. Lo anterior contribuirá en un futuro a proponer estrategias novedosas para desarrollar métodos de crioconservación mejorados.

Pérdida de electrolitos

En la figura 7 se representan las diferencias en cuanto a la pérdida de electrolitos: al comienzo del experimento, y luego disminuyó gradualmente en los días posteriores. Al tercer día alcanzó niveles similares al tratamiento control, y a partir de ese momento se mantuvo casi constante hasta el quinto día.

La gran pérdida de electrolitos (22%) en el tiempo cero después de la crioconservación se debe principalmente a la lisis celular que pudo tener lugar en algunas células de los callos crioconservados. Teniendo en consideración la hipótesis señalada por Mazur [63], por una parte se favorecerá la aparición de pequeños cristales de hielo en el interior de células que no estén bien deshidratadas. Durante la descongelación éstas pueden aumentar de volumen y provocar la lisis celular con la pérdida de la semipermeabilidad de la membrana plasmática. Por otra parte, la deshidratación excesiva durante el enfriamiento lento favorecerá la lisis celular por el aumento de la concentración de compuestos tóxicos

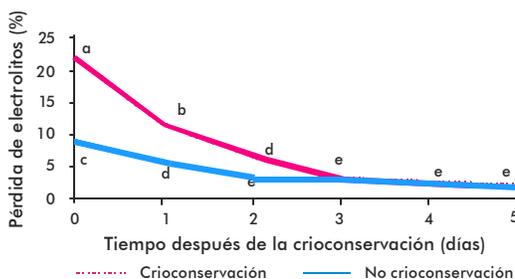


Figura 7. Cambios en la pérdida de electrolitos después de la crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas de la variedad CP52-43. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Duncan, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis según $x = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$. Error típico = 0.10.

intracelulares, cambios en el pH y en la actividad enzimática.

La disminución de la pérdida de electrolitos hasta el tercer día después de la crioconservación, sugiere que es posible una recuperación en las membranas plasmáticas. Algunos estudios con células de trigo crioconservadas evidencian que el material membranoso se puede separar de la membrana plasmática y formar pequeñas vesículas endocitóticas en el citoplasma [64, 65]. Estas vesículas se mantienen intactas en el estado vítreo durante la congelación en nitrógeno líquido, y existen indicios de que se pueden reincorporar de manera lenta a la membrana plasmática durante la descongelación-rehidratación para reparar sus daños [66]. El tráfico de vesículas en plantas es posible mediante un mecanismo de transporte vesicular en las endomembranas.

Tras el tratamiento sin crioconservación, se observaron variaciones en la pérdida de electrolitos durante los primeros cinco días después de la transferencia del callo hacia el medio de cultivo fresco. Estas se asocian fundamentalmente con el daño mecánico de la membrana, causado por el corte de los callos durante la selección del material inicial [67].

Productos de la peroxidación lipídica

En la figura 8 se aprecian las diferencias significativas en el contenido de los productos de la peroxidación lipídica (malondialdehído), durante los tres primeros días del experimento. El pico máximo fue al segundo día, y los mayores valores se corresponden con los callos crioconservados.

Para comprender los resultados es importante tener en cuenta que los daños biofísicos en las membranas plasmáticas no son la única causa de pérdida de viabilidad celular, también lo son los cambios bioquímicos. En la actualidad existen algunas evidencias que sugieren la presencia de los radicales libres (mediadores del estrés oxidativo) durante diferentes etapas de la crioconservación [68]. Es decir, las membranas celulares que sean sensibles a la deshidratación, serán atacadas por los radicales libres, lo cual provocará su peroxidación lipídica, con la consiguiente liberación de malondialdehído y otros aldehídos. Así, los valores elevados de estos últimos en el tiempo cero después de la crioconservación, son posibles debido al propio mecanismo de tolerancia que deben alcanzar las membranas celulares

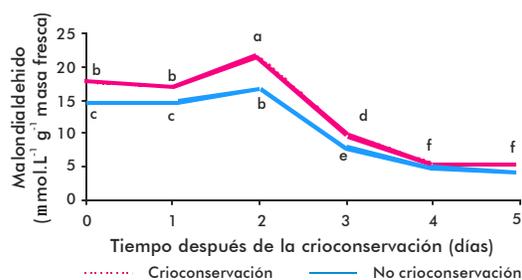


Figura 8. Cambios en el contenido de malondialdehído después de la crioconservación de los callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas, variedad CP52-43. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Duncan, $p < 0.05$). Error típico = 0.15 mol.L⁻¹ g⁻¹ masa fresca.

58. Krishnamurthy KV, Kishnaraj R, Choza vendam R, Samuel CF. The pro-gramme of cell death in plants and animals. A comparison. *Curr Sci* 2000;79: 1169-81.

59. Joyce SM, Cassells AC, Jain MS. Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2003;74:103-21.

60. Chen THH, Kartha KK, Constable F, Gusta LV. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant Physiol* 1984;75:720-5.

61. Tyler N, Stushnoff C, Gusta LV. Freezing of water in dormant vegetative apple buds in relation to cryopreservation. *Plant Physiol* 1988;87:201-5.

62. Ishikawa M, Ide H, Price WS, Arata Y, Kitashima T. Freezing behaviors in plant tissues as visualized by NMR microscopy and their regulatory mechanisms. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japón / IPGRI, Roma, Italia, 2000:22-35.

63. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 1970;168: 939-49.

64. Meryman HT, Williams RJ. Basic principles of freezing injury to plant cells; natural tolerance and approaches to cryopreservation. En: KK Kartha (ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Press, Boca Raton FL 1985:13-48.

65. Singh J, Miller RW. Biophysical and ultrastructural studies of membrane alterations in plant cells during extracellular freezing: molecular mechanism of membrane injury. En: KK Kartha (ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Press, Boca Raton FL 1985:61-73.

66. Fujikawa S, Jitsuyama Y. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification. En: Engelmann F, Takagi H (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japón / IPGRI, Roma, Italia, 2000:36-42.

67. Fleck RA, Day JG, Clarke KJ, Benson EE. Elucidation of the metabolic and structural basis for the cryopreservation recalcitrance of *Vaucheria sessilis*. *Cryo-Letters* 1999;20:271-82.

68. Benson EE. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In vitro Cell Dev Biol Plant* 2000;36:163-70.

durante la deshidratación por el enfriamiento lento a que están sometidas las células de los callos.

Según Wolfe y Bryant [69], los procesos de deshidratación por enfriamiento lento y la desecación en atmósfera con baja humedad relativa, tienen características comunes debido a la gran pérdida de agua por ósmosis (aproximadamente el 10%) en las células vegetales antes de alcanzar el estado vítreo. Desde el punto de vista molecular, existe una convergencia entre ambos tipos de estrés. Ello se observa mediante los análisis de secuencia que la mayoría de los genes inducidos durante la desecación o las bajas temperaturas contienen una variedad de *motif* repetitivos con un elevado grado de conservación [70]. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos de tolerancia a la desecación será de vital importancia para interpretar los resultados de las células vegetales crioconservadas [71].

Al estudiar los mecanismos de tolerancia a la desecación en las células vegetales, Hoekstra y cols., Oliver y cols. [71, 72] plantean que la partición de metabolitos anfífilos (cuando estos aumentan en el citoplasma por la pérdida de agua) desde el citoplasma hacia la fase lipídica, provoca perturbaciones en las membranas celulares. Estas perturbaciones podrían causar el desacoplamiento metabólico de la cadena transportadora de electrones y provocar un incremento de la formación de especies reactivas del oxígeno [73].

Existen investigaciones que confirman la relación entre la reducción del metabolismo (evaluado como reducción de la tasa de respiración) y la supervivencia a la desecación [74] o la crioconservación [68]. Sin embargo, la naturaleza de esta presumible regulación pasiva del metabolismo es desconocida. Hoekstra y cols. [72] plantean que debe existir un control coordinado de la energía metabólica durante la tolerancia a la desecación, como esencia para evitar las condiciones de estrés oxidativo y/o acumulación de los productos secundarios hasta concentraciones tóxicas.

Por lo tanto, el comportamiento de los valores de los productos de la peroxidación lipídica al siguiente día de la crioconservación sin variaciones aparentes, podría deberse por el mecanismo de disminución del metabolismo celular y la reestructuración del material crioconservado. El pico observado al segundo día debe corresponder con la activación del metabolismo celular que provocará el aumento de las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno y una extensa peroxidación lipídica en las membranas no recuperadas.

También se observó que los productos de la peroxidación lipídica resultaron elevados para los controles. Ello está asociado a daños mecánicos de las membranas, al igual que en la pérdida de electrolitos. Fleck y cols. [67] describieron un incremento de los productos de la peroxidación lipídica después de realizar cortes de filamentos de algas en secciones. Además, la transferencia del material a un medio fresco constituye otra fuente de estrés que causa un aumento de las especies reactivas del oxígeno [75, 76].

El contenido de malondialdehído disminuyó a partir del segundo día hasta el cuarto día y se mantuvo constante al quinto día en ambos grupos de callos (crioconservados y no crioconservados).

Esta disminución al tercer día pudo causar la activación de los mecanismos de defensa antioxidantes y asimiladores de radicales libres [77]. Las plantas poseen moléculas antioxidantes y sistemas asimiladores como β -carotenos, isómeros del tocoferol, ácido ascórbico, glutatión y un sistema enzimático procesador de radicales libres que incluye la superóxido dismutasa, catalasas, glutatión reductasa, peroxidasas y otros [76, 78, 79]. Estos sistemas antioxidantes se pueden activar de manera directa por el estrés oxidativo y como consecuencia disminuir los niveles de las especies reactivas del oxígeno [76, 77].

Proteínas

En la figura 9 se representan los niveles de proteínas totales de la fracción microsomal, los que se manifiestan más elevados en los callos crioconservados durante los tres primeros días posteriores a la descongelación. Al cuarto día se igualaron los niveles de proteínas en ambos tratamientos.

Las diferencias significativas de los valores de las proteínas en el tiempo cero después de la crioconservación, deben estar asociadas a una variedad de genes que se inducen por el estrés de las bajas temperaturas y la deshidratación en diferentes especies vegetales. Estos factores pueden provocar la síntesis de proteínas. Según Shinozaki y cols. [80], entre las funciones principales de los genes inducidos está la de proteger las membranas celulares del estrés, mediante la producción de importantes proteínas metabólicas.

Svensson y cols. [81] han encontrado proteínas de respuesta a las bajas temperaturas o deshidratación, que se encuentran dentro del grupo de las dehidrinas. La mayoría de estas se determinaron en embriones de maíz y se asociaron con el sistema de endomembranas del citoplasma [82].

El incremento de proteínas al primer y segundo día de la crioconservación de los callos, pudiera estar asociado con la reparación que ocurre en la membrana plasmática, según la pérdida de electrolitos. Supuestamente se debe incrementar el tráfico de las vesículas a través del sistema de endomembranas, y esto se realiza mediante la fusión de ciertas proteínas específicas con las membranas, para que ocurra el transporte vesicular. Además, existen proteínas, como la peroxiredoxina, que se incrementan para contrarrestar el estrés ocasionado en las membranas por las especies reactivas del oxígeno [71].

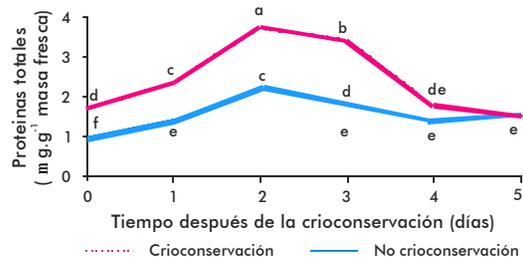


Figura 9. Cambios en el contenido de proteínas totales después de la crioconservación de los callos (variedad CP52-43). Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Error típico = $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa fresca.

69. Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* 1999;39:103-29.

70. Guy C. Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999;1(2):231-42.

71. Oliver AE, Leprince O, Wolkers WF, Hinch DK, Heyer AG, Crowe JH. Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology* 2001;43:151-67.

72. Hoekstra FA, Golovina EA, Buitnik J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 2001;6(9):431-8.

73. Hoekstra FA, Golovina EA. Membrane behaviour during dehydration: implications for desiccation-tolerance. *Russ J Plant Physiol* 1999;46:295-306.

74. Pammeter NW, Berjak P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Sci Res* 1999;9:13-37.

75. Williams R. The chemical microenvironment. En: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith M (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers 1995:405-38.

76. Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 2002;37:263-85.

77. Cassells AC, Curry RF. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2001;64:145-57.

78. Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 1993;3:231-46.

79. Moller IM. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 2001;52:561-91.

80. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 2003;6:410-7.

La disminución de las proteínas a partir del segundo día, puede relacionarse con que el aumento del malondialdehído y otros aldehídos derivados se considera citotóxico y genotóxico, debido a que ellos modifican la estructura de las proteínas, forman complejos con el ácido desoxirribonucleico e inhiben la síntesis del ácido nucleico [83-85]. Es decir, las proteínas pueden iniciar rápidamente un mecanismo de respuesta al estrés oxidativo y tener función de molécula señal o ser dañadas, tal como se ha observado en plantas que presentan la expresión génica de las proteínas pequeñas de choque térmico [86]. Algunas de las proteínas inducidas durante el proceso de congelación-descongelación pueden desempeñar también una función importante en la disminución de los niveles endógenos de malondialdehído y aldehídos, además de todas las otras funciones mencionadas.

Las tres técnicas analíticas utilizadas en este estudio, constituyen una fuente esencial de información. Ellas evidencian las posibles causas de los daños de las membranas celulares, y permiten sugerir también las reparaciones que existen en las membranas para que algunos daños sean mínimos, y de esta forma lograr el éxito de la criopreservación. En ese sentido, la metodología propuesta también podría constituir un paradigma para estudios avanzados y esclarecer mecanismos de tolerancia en las células durante la deshidratación y congelación.

Validación de la metodología de criopreservación para callos de diferentes procedencias del explante y variedades

En la tabla 4 se muestra el efecto del almacenamiento en nitrógeno líquido para la validación de la metodología de criopreservación desarrollada y enunciada antes. Es importante señalar que hasta este momento no se había hecho una validación en el tiempo de la supervivencia y la capacidad regenerativa de los callos de caña de azúcar criopreservados.

Los callos mantenidos mediante subcultivos periódicos mensuales, a partir de los ocho meses sufrieron una marcada disminución de la capacidad de regeneración de plantas. Sin embargo, los callos criopreservados mantuvieron índices de supervivencia y regeneración de plantas elevados, independientemente del tiempo que permanecieron almacenados en nitrógeno líquido. No hubo diferencias significativas entre las variables evaluadas en el material criopreservado.

La capacidad regenerativa de los callos no criopreservados es una gran problemática que se debe de estudiar en las investigaciones biotecnológicas [6]. Esto podría estar asociado a la pérdida de la totipotencia celular, por el fenómeno de habituación de los cultivos a las hormonas utilizadas en el medio de cultivo. Se reconoce que las células en los callos pueden pasar a un estado de independencia parcial o total cuando se habitúan al suplemento exógeno de las auxinas o citoquininas, y esto con lleva a la disminución y pérdida irreversible de la capacidad regenerativa [76].

Otra de las posibles causas son los cambios de los productos de la peroxidación lipídica, provocado por las especies reactivas del oxígeno durante el traspaso de los callos desde un medio que contiene auxinas hacia un medio libre de hormonas [68, 77]. Existen evidencias que demuestran una correlación de la

Tabla 4. Validación de la metodología de criopreservación según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido en la supervivencia, en el porcentaje de callos que regeneraron plantas y en la regeneración de plantas a partir de callos de caña de azúcar (variedad CP52-43) con estructuras embriogénicas, criopreservados (+NL) y no criopreservados (-NL)

	Tiempo (meses)	Supervivencia (%)	Callos que regeneraron plantas (%)	Regeneración (plantas por 500 mg de callos)
-NL	1	100 a	100.0 a	225.2 a
	4	98.6 a	100.0 a	224.3 a
	8	96.7 ab	66.7 b	77.0 c
	12	97.5 ab	7.1 c	19.1 d
	16	11.5 c	0.0 d	0.0 e
+NL	1	90.6 b	96.7 a	149.3 b
	4	87.6 b	97.8 a	142.9 b
	8	88.0 b	93.3 a	135.1 b
	12	86.4 b	97.0 a	141.7 b
	16	90.0 b	97.5 a	140.3 b
Error típico		0.189	0.253	1.312

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para los valores de porcentajes según: $x' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$; y el número de plantas regeneradas, de acuerdo con: $x = (0.5 + x')^{0.5}$.

capacidad de proliferación y envejecimiento de los callos con el aumento de las bases Schiff y actividades de los sistemas antioxidantes [87].

Realizar un estudio sobre el tiempo de almacenamiento de las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno, el malondialdehído y los sistemas antioxidantes asociados, durante los subcultivos y compararlos con los mismos niveles del material criopreservado, evidencia que la metodología de criopreservación establecida desempeña una función importante.

Los valores de la supervivencia y la regeneración de plantas durante el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido, garantizan disponer de material embriogénico con una elevada capacidad de regeneración de plantas a largo plazo (hasta 16 meses). Se demostró que las colecciones de callos mantenidas por subcultivos periódicos y utilizadas en los programas de embriogénesis, paulatinamente fueron perdiendo su capacidad regenerativa; por lo tanto, solo representan una solución eficiente a corto plazo.

Validación de la metodología de criopreservación para callos de caña de azúcar, cuyas procedencia y explante son diferentes

Procedencia del explante

En la tabla 5 se muestra la validación de la metodología propuesta para criopreservar callos con estructuras embriogénicas, obtenidos a partir de hojas inmaduras de plantas *in vitro* y de inflorescencias inmaduras. Según la procedencia del explante, hubo diferencias significativas.

Tabla 5. Validación de la metodología para criopreservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas, obtenidos a partir de hojas inmaduras de plantas *in vitro*, según la supervivencia y la regeneración de plantas (variedad CP52-43)

Procedencia del explante	Supervivencia (%)	Regeneración (plantas/500 mg de callos)
Inflorescencias inmaduras	90.3 a	150 a
Hojas inmaduras de plantas <i>in vitro</i>	71.4 b	82 b
Error típico	0.23	1.85

Medias con letras iguales no difieren (t-test, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis del porcentaje de supervivencia según: $x' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$; y el número de plantas regeneradas, de acuerdo con: $x = (0.5 + x')^{0.5}$.

81. Svensson J, Ismail AM, Palva ET, Close TJ. Dehydrins. En: Storey KB, Storey JM (eds.). Sensing Signaling and Cell Adaptation. Elsevier Science 2002;155-71.

82. Egerton-Warburton LM, Balsamo RA, Close TJ. Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays* L. *Physiol Plant* 1997;101:545-55.

83. Esterbauer H, Zollner H, Schauer RJ. Hydroxylalkenals: Citotoxic products of lipid peroxidation. En: ISI Atlas of Sciences: Biochemistry 1988:311-7.

84. Grune T, Michel P, Sitte N, Eggert W, Albrecht-Nebe H, Esterbauer H, Siems WG. Increased levels of 4-hydroxy-nonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases. *Free Radicals in Biology and Medicine* 1997;23:357-60.

85. Harding K, Benson EE. Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato. *Cryo-Letters* 2000;21:279-88.

86. Sun W, Montagu MV, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochem et Biophys Acta* 2000;1577:1-9.

87. Benson EE y Roubelakis-Angelakis KA. Oxidative stress in recalcitrant tissue cultures of grapevine. *Free Radicals in Biology and Medicine* 1994;16:355-62.

Los valores más elevados de supervivencia y regeneración de plantas se obtuvieron en los callos formados de inflorescencias inmaduras.

Hasta la fecha, las publicaciones relacionadas con la crioconservación de callos de caña de azúcar, solo han informado resultados favorables en la crioconservación de callos obtenidos a partir de hojas inmaduras de plantas *in vitro* [16-18]. Por tanto, este estudio es el primero que trata la crioconservación de callos obtenidos de segmentos de inflorescencias inmaduras y su comparación con callos crioconservados a partir de hojas inmaduras.

Morrish y cols. [88] señalan que la capacidad embriogénica de los cultivos está influenciada por varios factores; el explante, el tipo de hormona y el genotipo son los que inciden en mayor medida. Krishnaraj y Vasil [22], refieren que el genotipo se ha considerado como un factor importante en la respuesta de los tejidos cultivados *in vitro*, aunque afirman que está muy relacionado con el estado fisiológico del explante. Castillo [8] demostró que los callos formados de segmentos de inflorescencias inmaduras presentan un nivel de crecimiento superior a los callos formados a partir de explantes de hojas inmaduras de plantas cultivadas *in vitro*. Por su parte, Benson y Roubelakis-Angelakis [87] demostraron que explantes de diferentes fuentes respondieron de distinta forma durante la iniciación del cultivo *in vitro* y como resultado sufrieron varios niveles de estrés oxidativo. Los autores sugirieron que esto trae importantes consecuencias para la iniciación *in vitro*, y que la selección del explante es esencial para el establecimiento de cultivos competentes.

Por lo tanto, los resultados de supervivencia y regeneración de plantas después de aplicada la crioconservación, no tienen que coincidir necesariamente con los diferentes tipos de explantes utilizados para iniciar los callos. Es decir, estos resultados pueden mejorarse tomando en consideración el estado fisiológico del callo durante el proceso de selección inicial y siguiendo las demás etapas propuestas en la metodología de crioconservación.

Diferentes variedades

En la tabla 6 se muestra la validación de la metodología de crioconservación desarrollada en los acápite anteriores con diferentes variedades de caña de azúcar.

Tabla 6. Validación de la metodología de crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas (variedades C91-301 y C1051-73) en la supervivencia y regeneración de plantas, material no crioconservado (-NL) y material crioconservado (+NL)

Variedades	Supervivencia (%)	Regeneración (plantas por 500mg de callos)
CP52-43	98.8 a	230 a
-NL C91-301	69.5 c	72 c
C1051-73	44.1 d	55 d
CP52-43	89.0 b	150 b
+NL C91-301	38.8 d	42 e
C1051-73	22.2 e	25 f
Error típico	0.190	1.421

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los datos se transformaron para el análisis del porcentaje de supervivencia según: $x' = 2 \arcsin [(x/100)0.5]$; y el número de plantas regeneradas, de acuerdo con: $x' = (0.5 + x)0.5$.

La extensión de la metodología permitió obtener supervivencia entre el 22.2 y el 89% después de la crioconservación en todos los casos. Sin embargo, tanto la supervivencia como la regeneración de plantas, obtenidas con los callos de las variedades C91-301 y C1051-73, fueron significativamente inferiores a los logrados con la CP52-43.

Los resultados de estos estudios muestran las posibilidades de la aplicación exitosa de la metodología de crioconservación de callos de caña de azúcar propuesta, utilizando un procedimiento simple de enfriamiento para otras variedades. Sin embargo, es necesario realizar ajustes tomando en consideración los factores analizados en los epígrafes anteriores como son: tiempo de post-subcultivo, las concentraciones de sacarosa y las concentraciones de dimetilsulfóxido. Una primera etapa es la puesta a punto de un sistema eficiente de propagación *in vitro* a partir de callos de caña de azúcar, para aplicar las técnicas de crioconservación, ya que estas últimas llevan los protocolos del cultivo de tejidos tanto para la obtención como para la regeneración de los cultivos embriogénicos [5].

Estudio del comportamiento *ex vitro* de las plantas de caña de azúcar regeneradas a partir de callos crioconservados

En la tabla 7 se comparan el diámetro, la longitud, así como la cantidad de tallos por metro lineal, en condiciones de cultivo en campo de las plantas regeneradas a partir de callos crioconservados, con testigos procedentes de callos no crioconservados y de la propagación vegetativa convencional (variedad CP52-43), a los seis meses. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos de las tres variables evaluadas, pero estas no fueron significativas entre los grupos de plantas procedentes de material crioconservado y no crioconservado.

Los resultados de las variaciones a los seis meses de crecimiento de la caña planta en campo, pero sin diferencias significativas entre los grupos de plantas procedentes de material crioconservado y no crioconservado, parecen tener su origen en el efecto del cultivo *in vitro* y no durante la crioconservación. Es decir, existen diferencias significativas donde el número de tallos por metro lineal es mayor en el material de procedencia *in vitro*; sin embargo, el diámetro y la altura de las plantas son menores que en el material que procede del campo.

Estas diferencias coinciden con lo informado por otros autores cuando comparan plantas regeneradas del material *in vitro* y del material de campo de la caña de azúcar. Algunos investigadores plantean que el cultivo de tejidos reduce los componentes del rendimiento, como

88. Morrish F, Vasil V, Vasil IK. Developmental morphogenesis and manipulation in tissue and cell cultures of the Gramineae. *Adv Genet* 1987;24:431-99.

Tabla 7. Comparación en campo de las plantas obtenidas a partir de callos con estructuras embriogénicas crioconservados con testigos regenerados de callos no crioconservados y de propagación vegetativa convencional, después de seis meses de crecimiento en campo de la cepa planta

Evaluación	Origen de la cepa planta			Error típico
	Callos crioconservados	Callos no crioconservados	Yemas aisladas	
Diámetro de los tallos (cm)	1.51 b	1.45 b	1.82 a	0.12
Longitud de los tallos (m)	0.57 b	0.49 b	0.85 a	0.10
Cantidad de tallos (tallos/m)	5.20 a	5.45 a	4.22 b	0.35

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

la masa y el diámetro de los tallos; sin embargo, incrementa la población de tallos [11, 89-92].

Las formas de manifestarse el efecto del cultivo *in vitro* podría explicarse porque en el número de tallos por metro lineal, los materiales multiplicados *in vitro* siempre experimentan un rejuvenecimiento, en comparación con el material que se propaga de manera vegetativa. Por tanto, en mejores condiciones fisiológicas, las plantas son capaces de generar mayor cantidad de tallos. El diámetro y la longitud de los tallos dependerán de la competencia que se establece entre las plantas al aumentar la densidad de tallos (hasta 25%) por unidad de área. Sin embargo, al realizar las evaluaciones de los diferentes caracteres agrícolas de la caña planta (tabla 8) y del primer retoño (tabla 9), no se observaron diferencias significativas entre el material de procedencia *in vitro* y el de campo.

Los resultados indican que el crecimiento de las plantas derivadas de callos crioconservados no difiere entre sí después de que la cepa planta esté 12 meses en el campo y 15 meses, el primer retoño. Además, fue necesario esperar 6 meses con el material en condiciones de cultivo en campo para que las primeras diferencias pudieran ser eliminadas.

Ello coincide con lo informado sobre las bajas posibilidades de variación somaclonal o una reversión hacia las características fenotípicas originales, después de una propagación vegetativa de la caña de azúcar en el campo, lo cual disminuye las perspectivas de utilizar el cultivo de tejidos para la obtención de un nuevo cultivar. Algunos investigadores [2, 89, 90, 93, 94-96] indican que estas diferencias se reducen significativamente y se revierten hacia el fenotipo original en el transcurso del crecimiento en el campo y con la primera multiplicación clonal. Esto sugiere que las variaciones después del cultivo de tejidos parecen ser transitorias, como sucedió en esta investigación.

Este estudio confirma algunas evidencias de autores que indican la estabilidad del material vegetal después de la crioconservación [29, 97]. La originalidad e importancia de este experimento para la Criobionómica consiste en el gran número de muestras estudiadas por tratamiento (más de 400 plantas), la extensa duración del experimento (27 meses en el campo con dos ciclos de cultivos) y los análisis estadísticos con los caracteres agrícolas. Hasta la fecha, la comparación de la estabilidad del material crioconservado en condiciones *ex vitro* ha sido en casas

Tabla 9. Comparación entre plantas obtenidas a partir de callos con estructuras embriogénicas crioconservados, con testigos regenerados de callos no crioconservados y de propagación vegetativa convencional, después de 15 meses de crecimiento del primer retoño en campo

Evaluación	Origen de la cepa planta			Error Típico
	Callos crioconservados	Callos no crioconservados	Yemas aisladas	
Diámetro de los tallos (cm)	2.62	2.59	2.65	0.10
Longitud de los tallos (m)	1.93	1.98	2.04	0.16
Masa fresca del tallo (kg)	1.50	1.51	1.54	0.21
Cantidad de tallos (tallos/m)	9.77	9.65	10.09	2.20
Rendimiento agrícola (t/ha)	122.10	121.42	129.48	5.12
Brix del jugo (°brix)	23.22	23.02	22.98	1.79
Pol del jugo (% m/m)	20.45	20.07	19.95	1.85
Pureza aparente del jugo (%)	88.07	87.71	86.81	1.34
Fibra en caña (%)	12.9	12.17	12.5	0.35
Pol en caña (% m/m)	17.81	17.62	17.45	1.80
Rendimiento agroindustrial (t/ha)	21.75	21.35	22.59	1.51
Rendimiento agrícola/ rendimiento agroindustrial	5.61	5.67	5.73	0.11

No se encontraron diferencias estadísticas (ANOVA).

de cultivo, después de un corto período de crecimiento de las vitroplantas, a partir de observaciones, sin tener en cuenta los análisis estadísticos [57, 98-102].

El estudio que más coincide con los resultados de esta propuesta metodológica es el realizado por Cote y cols. [103]. Estos autores informaron el comportamiento de plantas de banano en condiciones de campo, obtenidas de la regeneración, a partir de suspensiones celulares crioconservadas y controles, cuando evaluaron diferentes descriptores del desarrollo vegetativo del cultivo. Durante el primer ciclo del cultivo se encontraron diferencias en dos de los once descriptores utilizados; y en el segundo ciclo no se encontraron diferencias significativas.

Los resultados de la variación fenotípica inicial en papa, bananos o en la caña de azúcar, pueden tener su origen en un efecto residual persistente y aún desconocido del cultivo de tejidos [97]. Algunos autores [104] se refieren a la herencia somática de los caracteres y a la reducción del efecto del cultivo de tejidos con varios ciclos de crecimiento vegetativo. Por lo tanto, se sugiere que la variación inicial no sea heredada en las subsiguientes generaciones somáticas, como se observó en las plantas procedentes de material crioconservado. Se ha informado que este tipo de variación es inestable, o sea, son eventos epigenéticos [77]. Además, se plantea que las plantas requieren la regulación epigenética para

89. Kresovich S, McGee RE, Drawe HJ, Rivera JL. Variability of agronomic characteristics in populations of tissue culture-derived and vegetatively propagated sugarcane. Proc Int Soc Sugarcane Technol 1986;19:528-32.

90. Lourens AG, Martin FA. Evaluation of *in vitro*-propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. Crop Sci 1987;27:793-6.

91. Burner DM, Grisham MP. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. Crop Sci 1995;35:875-80.

92. Hoy JW, Bischoff KP, Milligan SB, Gravois KA. Effect of tissue culture explant on sugarcane yield components. Euphytica 2003;129:237-40.

93. Ploper DL, Mariotti JA. Variability of yield components in subclones from tissue culture in sugarcane. Sugarcane Breed News March 1978;41:29-30.

94. Irvine JE, Benda GTA, Legendre BL, Machado GR. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus-culture. Evidence for vegetative and genetic transmission, pigenetic effects and chimeral disruption. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1991;26:115-25.

Tabla 8. Comparación entre plantas obtenidas a partir de callos de caña de azúcar (variedad CP52-43) crioconservados y testigos no crioconservados, después de 12 meses de crecimiento en campo

Evaluación	Origen de la cepa planta			Error Típico
	Callos crioconservados	Callos no crioconservados	Yemas aisladas	
Diámetro de los tallos (cm)	2.58	2.51	2.66	0.09
Longitud de los tallos (m)	1.85	1.90	1.70	0.11
Masa fresca del tallo (kg)	1.37	1.33	1.49	0.09
Cantidad de tallos (tallos/m)	9.80	10.55	9.32	1.50
Rendimiento agrícola (t/ha)	111.88	116.93	115.72	2.62
Brix del jugo (°brix)	22.07	21.22	24.69	1.87
Pol del jugo (% m/m)	19.17	18.37	19.35	1.93
Pureza aparente del jugo (%)	86.86	86.57	86.47	1.33
Fibra en caña (%)	11.55	11.23	11.52	0.43
Pol en caña (% m/m)	16.95	16.30	17.12	1.90
Rendimiento agroindustrial (t/ha)	18.96	19.06	19.81	1.51
Rendimiento agrícola/ rendimiento agroindustrial	5.89	6.13	5.84	0.68

No se encontraron diferencias estadísticas (ANOVA).

mantener su plasticidad genómica en el desarrollo, durante su interacción con el medio ambiente [59].

En general, no hubo diferencias fitosanitarias en cuanto a las observaciones fitosanitarias de las enfermedades de primer orden de la caña de azúcar en las distintas parcelas, en los tres tratamientos. Para el carbón (*Ustilago scitaminea* H. Sydow) se determinó como promedio, un índice de infección de los tallos menor que el 5%, que se manifestó principalmente por la formación de látigos. Para la roya (*Puccinia melanocephala* H. y P. Sydow) se determinó como promedio un índice de infección menor que el 15%, con síntomas de manchas cloróticas y necróticas con pequeñas protuberancias en el envés de las hojas viejas.

Metodología integradora para la crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas, obtenidos a partir de inflorescencias inmaduras

Con los resultados de estos estudios se logró establecer una metodología integradora para la crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas, obtenidos a partir de inflorescencias inmaduras (Figura 10). En esta se integran todas las etapas de trabajo, que incluyen: selección del callo, crioprotección, procedimiento simple de enfriamiento hasta -40°C , almacenamiento en nitrógeno líquido, descongelación, recuperación, regeneración de plantas, aclimatización

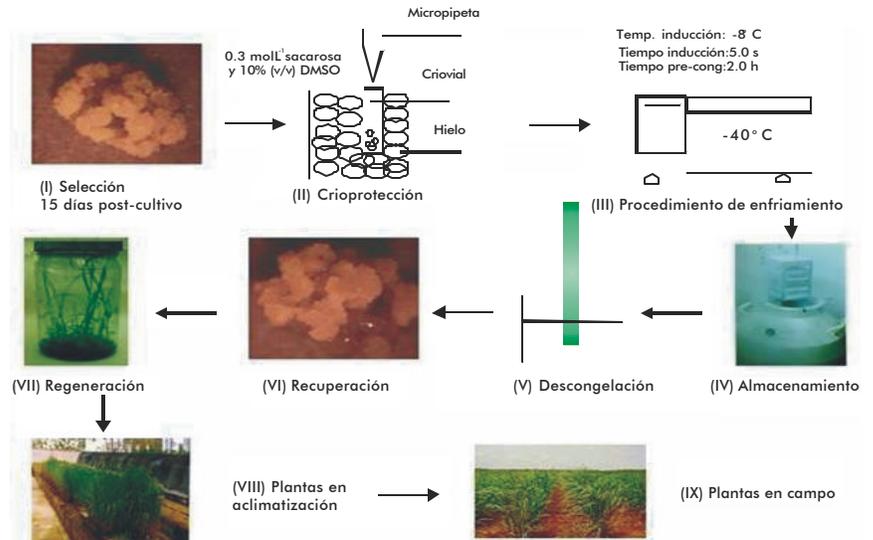


Figura 10. Metodología integradora para la crioconservación de callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas.

de las plántulas regeneradas, evaluación de los indicadores fisiológicos, y determinación de los rendimientos agrícola y agro-industrial durante 27 meses, en dos ciclos de cultivo.

95. Jiménez E, Pérez J, Gil V, Herrera J, García Y, Alfonso E. Sistema para la propagación de la caña de azúcar. En: Estrada M, Riego E, Limonta E, Tellez P, Fuente J (eds.). Avances en Biotecnología Moderna. Cuba: Elfos Scientiae 1995;11(2).

96. Lorenzo JC, Ojeda E, Espinosa A, Borroto C. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 2001; 37(6):803-6.

97. Harding K. Genetic integrity of cryo-preserved plant cells: A Review. *Cryo-Letters* 2004;25:3-22.

98. Engelmann F. *In vitro* conservation of tropi-

cal plant germplasma review. *Euphytica* 1991;57:227-43.

99. Marin ML, Gogorcena Y, Ortiz J, Duran-Vila N. Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1993;34:27-33.

100. Park YS, Barret JD, Bonga JM. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry. *In vitro Cell Develop Biol Plant* 1998;34:231-9.

101. Helliot B, Madur D, Dirlwanger E, De Boucaud MT. Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Prunus*. *In vitro Cell Dev Biol - Plant* 2002;38:493-500.

102. Dixit S, Mandal BB, Ahuja S, Srivastava PS. Genetic stability assessment of plant regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. *Cryo-Letters* 2003;24:77-84.

103. Cote FX, Goue O, Domergue R, Panis B, Jenny C. In field behavior of banana plants (*Musa AA* sp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *Cryo-Letters* 2002;21:19-24.

104. Scowcroft WR. Genetic variability in tissue culture: Impact on germplasm conservation and utilization. Technical Report IBPGR, Roma, Italia, 1984.