

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE OSMORREGULADORES E INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO EN LA CONSERVACIÓN *in vitro* DE CAÑA DE AZÚCAR

COMPARISON OF EFFECT OF OSMOREGULATORS AND GROWTH INHIBITORS ON *in vitro* CONSERVATION OF SUGARCANE

Jericó Bello-Bello^{1*}, Wilberth Poot-Poot², Lourdes Iglesias-Andreu²,
Humberto Caamal-Velázquez³, María de la Cruz Díaz-Sánchez⁴

¹Campus Córdoba. Colegio de Postgraduados. 94946. Veracruz, México. (jericobello@gmail.com). ²Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana, Avenida de las Culturas Veracruzanas No. 101. Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Colonia Emiliano Zapata, Xalapa, Veracruz, México C.P. 91090. ³Campus Campeche. Colegio de Postgraduados. 24450. Campeche, México. ⁴Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de Caña de Azúcar del Ingenio San Rafael de Pucté, Domicilio Conocido, Othón P. Blanco, Chetumal, Quintana Roo, México. C.P. 77980.

RESUMEN

Los sistemas de conservación *in vitro* son una alternativa para preservar el germoplasma de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los osmorreguladores manitol y sorbitol (0, 15, 30 y 45 g L⁻¹) y los inhibidores del crecimiento vegetal ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC) (0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹) sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azúcar. Para ello se usaron brotes *in vitro* de 2 cm de altura de la variedad Mex-69-290 obtenidos en fase de multiplicación y en todos los casos se empleó el medio MS (Murashige y Skoog). El diseño experimental fue completamente al azar con 10 explantes por tratamiento, con los datos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). A los 180 d de cultivo se evaluó el porcentaje de supervivencia, el número y longitud de los brotes, número de hojas, número y longitud de las raíces. El análisis de los resultados mostró que el aumento en las concentraciones de los osmoreguladores causó una reducción dependiente de la concentración en todas las variables evaluadas. Para los inhibidores, los tratamientos con PAC mantuvieron 100 % de supervivencia, promoviendo el número de brotes por explante. Esto contrastó con los tratamientos con ABA donde disminuyeron las variables evaluadas. La reducción en altura y presencia de brotes axilares observada en los tratamientos con PAC sería de interés para la conservación *in vitro*, y se concluye que el uso de PAC puede ser una nueva alternativa para la conservación *in vitro* del germoplasma de esta especie.

ABSTRACT

In vitro conservation systems are an option for preserving sugarcane germplasm (*Saccharum* sp.). The objective of this study was to assess the effect of the osmoregulators manitol and sorbitol (0, 15, 30 and 45 g L⁻¹) and the plant growth inhibitors abscisic acid (ABA) and paclobutrazol (PAC) (0, 1, 2 and 3 mg L⁻¹) on *in vitro* growth of sugarcane. The plants used were 2 cm tall *in vitro* shoots of the variety Mex-69-290 obtained in the multiplication phase. In all cases MS (Murashige and Skoog) medium was used. The experimental design was completely random with 10 explants per treatment. Data were analyzed with an analysis of variance (ANOVA) and means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). After 180 d of culture, survival percentage, number and length of the shoots, number of leaves, and number and length of roots were assessed. Analysis of the results showed that an increase in concentrations of osmoregulators produced a decrease in all of the variables assessed. For the inhibitors, the PAC treatments maintained 100 % survival and promoted more shoots per explant. This contrasted with the ABA treatments in which the assessed variables decreased. Reduction in height and presence of axillary shoots observed in treatments with PAC may be of interest for *in vitro* conservation, and, it is concluded that the use of PAC would be a new option for *in vitro* conservation of sugarcane germplasm.

Key words: *Saccharum* sp., sorbitol, manitol, abscisic acid, paclobutrazol.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2013. Aprobado: abril, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 48: 439-446. 2014.

Palabras clave: *Saccharum* sp., sorbitol, manitol, ácido abscísico, paclobutrazol.

INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) son la base del desarrollo de los programas de mejoramiento genético y de producción de semilla en esta especie (Flores, 2001). El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta de la biotecnología que se puede aplicar a los esquemas de conservación *in vitro* de germoplasma (Pence *et al.*, 2002), para lo cual se requiere reducir el crecimiento de las células o tejidos para prolongar los periodos entre subcultivos y disminuir los costos durante el proceso de conservación *in vitro*.

Una alternativa para reducir la tasa de crecimiento *in vitro* es usar inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (ABA) (Pence *et al.*, 2002; Sarasan *et al.*, 2006; Barrueto y Carvalho, 2008) y el paclobutrazol (PAC) (Ziv, 2000). El PAC pertenece al grupo de los triazoles, actúa como un retardador de crecimiento bloqueando la síntesis del ácido giberélico (AG), el cual es transportado por el xilema y puede ser absorbido por las hojas, tallos o raíces (Jankiewicz, 2003). Además, el PAC se usa en el cultivo de tejidos vegetales por su efecto positivo en la inducción de los procesos de organogénesis y embriogénesis somática (Ziv, 2000). Los métodos de crecimiento mínimo y crioconservación de caña de azúcar fueron evaluados por González-Arno *et al.* (1999), García *et al.* (2004) y Sarwar y Siddiqui (2004), pero en la literatura revisada no hay estudios comparativos sobre el uso de compuestos con efecto de estrés osmótico (osmorreguladores) e inhibidores del crecimiento que demuestren su eficiencia durante la conservación *in vitro* de esta especie.

Un aspecto importante cuando se establece un protocolo de conservación *in vitro* es mantener en el tiempo un número reducido de plántulas sin afectar su supervivencia. El método de conservación convencional del germoplasma *in vitro* es laborioso por el alto número de subcultivos y costos energéticos cuando la refrigeración se usa para reducir la temperatura. La crioconservación requiere un suministro constante de nitrógeno líquido cuyo uso no es rentable en laboratorios comerciales.

El Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de Caña de Azúcar del Ingenio San Rafael de

INTRODUCCIÓN

The genetic resources of sugarcane (*Saccharum* sp.) are the basis for developing genetic improvement and seed production programs for this species (Flores, 2001). Plant tissue culture (PTC) is a biotechnology tool that can be applied to *in vitro* plant germplasm conservation schemes (Pence *et al.*, 2002). In these schemes, it is necessary to reduce cell or tissue growth to prolong periods between subcultures and reduce costs during the *in vitro* conservation process.

One alternative for reducing *in vitro* growth rate is the use of growth inhibitors such as abscisic acid (ABA) (Pence *et al.*, 2002; Sarasan *et al.*, 2006; Barrueto and Carvalho, 2008) and paclobutrazol (PAC) (Ziv, 2000). PAC belongs to the group of triazoles and acts as a growth retarder by blocking synthesis of gibberellic acid (GA), which is transported through the xylem and absorbed by leaves, stems or roots (Jankiewicz, 2003). Moreover, PAC is used in plant tissue culture because of its positive effect on induction of organogenesis and somatic embryogenesis (Ziv, 2000). The methods of minimum growth and cryoconservation of sugarcane were assessed by González-Arno *et al.* (1999), García *et al.* (2004) and Sarwar and Siddiqui (2004), but in the reviewed literature there are no comparative studies on the use of compounds that affect osmotic stress (osmoregulators) or inhibit growth that show their efficiency during *in vitro* conservation of this species.

An important aspect to consider when establishing an *in vitro* conservation protocol is to maintain, over time, a reduced number of plantlets without affecting survival. The conventional method of *in vitro* germplasm conservation is tedious, because of the high number of subcultures, and energy-costly when refrigeration is used to reduce temperature. Cryoconservation requires constant supplies of liquid nitrogen, whose use is not profitable in commercial laboratories.

The Sugarcane *in vitro* Plant Tissue Culture Laboratory of the Sugar Complex San Rafael de Pucté, Chetumal, Quintana Roo, Mexico, has established more than 80 accessions *in vitro*, which include domestic and foreign hybrids. This number increases systematically with the new varieties generated by genetic improvement programs for this crop.

Pucté, Chetumal, Quintana Roo, México, ha establecido más de 80 accesiones *in vitro*, que incluyen híbridos nacionales y extranjeros. Esta cifra aumenta sistemáticamente con las nuevas variedades generadas de los programas de mejoramiento genético en este cultivo. Por ello, el objetivo del presente estudio fue mantener la supervivencia y reducir la tasa de crecimiento *in vitro* de los brotes para la conservación de germoplasma de la caña de azúcar a través de un estudio comparativo entre osmorreguladores (manitol y sorbitol) e inhibidores del crecimiento vegetal (ABA y PAC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de trabajo y material vegetal

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de Caña de Azúcar del Ingenio San Rafael de Pucté, ubicado en Chetumal, Quintana Roo, México (18° 30' 13" N; 88° 18' 19" O). Los explantes usados fueron brotes *in vitro* de 2 cm de altura de caña de azúcar var Mex 69-290 generados después de tres subcultivos de meristemos apicales (0.5-0.8 mm) en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), más un suplemento de 0.2 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), según la metodología de Jiménez *et al.* (1995).

Efecto de agentes osmóticos e inhibidores de crecimiento sobre la tasa de crecimiento *in vitro*

Los agentes osmóticos fueron manitol y sorbitol (Sigma®) a 0, 15, 30 y 45 g L⁻¹, y los inhibidores del crecimiento fueron ABA (Sigma®) y PAC (Syngenta®) a 0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹. En todos los experimentos se usaron tubos de ensayo de 22x220 mm con tapa de polipropileno (MOLLER®), conteniendo 15 mL de medio MS y 0.22 % (p/v) de Gelrite™ (Sigma®) como agente gelificante y se esterilizaron 15 min en autoclave a 1.5 kg cm⁻² de presión y 121 °C. El pH de los medios de cultivo fue 5.8. Los recipientes de cultivo, con un brote cada uno, fueron incubados a 24±2 °C y se mantuvieron con luz fluorescente (40-50 μmol m⁻² s⁻¹) y un fotoperiodo de 16 h luz. Después de 180 d de incubación se evaluó el porcentaje de supervivencia y la tasa de crecimiento *in vitro* de los brotes. Los testigos fueron brotes desarrollados en medio basal MS sin agentes osmóticos ni inhibidores.

Los brotes sobrevivientes fueron transferidos a fase de enraizamiento, colocando cada brote en medio MS adicionado con 3 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA). Finalmente, las vitroplantas fueron aclimatadas en invernadero y transferidas a campo bajo condiciones de riego.

The objective of this study was to maintain survival and reduce *in vitro* growth rate of shoots for conservation of sugarcane germplasm through a comparative study between osmoregulators (manitol and sorbitol) and plant growth inhibitors (ABA and PAC).

MATERIALS AND METHODS

Work area and plant material

The study was conducted in the Sugarcane *in vitro* Plant Tissue Culture Laboratory of the Sugar Complex San Rafael de Pucté, located in Chetumal, Quintana Roo, México (18° 30' 13" N; 88° 18' 19" W). The plant material used was 2 cm tall *in vitro* sugarcane shoots of the Mex 69-290 variety generated after three subcultures of apical meristems (0.5-0.8 mm) in MS (Murashige and Skoog, 1962) culture medium plus a supplement of 0.2 mg L⁻¹ benzylaminopurine (BAP), following the methodology of Jiménez *et al.* (1995).

Effect of osmotic agents and growth inhibitors on *in vitro* growth rate

The osmotic agents were manitol and sorbitol (Sigma®) at 0, 15, 30 and 45 g L⁻¹. The growth inhibitors used were ABA (Sigma®) and PAC (Syngenta®) at 0, 1, 2 and 3 mg L⁻¹. In all of the experiments 22x220 cm test tubes with a polypropylene stopper (MOLLER®) were used. These contained 15 mL MS medium and 0.22 % (w/v) Gelrite™ (Sigma®) as the gelling agent and were sterilized in an autoclave at a pressure of 1.5 kg cm⁻² and temperature of 121 °C. Culture medium pH was 5.8. The culture recipients, with one shoot each, were incubated at 24±2 °C and maintained with fluorescent light (40-50 μmol m⁻² s⁻¹) and a photoperiod of 16 h light. After 180 d of incubation, survival percentage and *in vitro* growth rate of the shoots was assessed. Shoots grown in MS medium without osmotic agents or inhibitors were used as controls.

Surviving shoots were transferred to a rooting phase in which each shoot was placed in MS medium supplemented with 3 mg L⁻¹ indolacetic acid (AIA). Finally, the vitroplants were acclimatized in a greenhouse and transplanted to an irrigated field.

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized, using 10 explants per treatment, treatments are described in Table 1 and the experiments were done in triplicate. With the data an

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos se describen en el Cuadro 1, y se usaron 10 explantes por tratamiento. Los experimentos se realizaron por triplicado, con los datos se realizó un ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando SPSS v. 11.5 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos osmorreguladores afectaron negativamente supervivencia y crecimiento de plántulas, lo cual se acentuó al aumentar las concentraciones de estos compuestos (Cuadro 1). Los tratamientos con 15, 30 y 45 g L⁻¹ de manitol mostraron supervivencias de 80, 70 y 43 %. No hubo diferencias significativas para el número de brotes en las concentraciones de manitol evaluadas. Sin embargo, 30 y 45 g L⁻¹ de manitol causaron diferencias significativas en longitud de los brotes, número de hojas, número y longitud de las raíces (Figura 1A). En los tratamientos con sorbitol el comportamiento fue similar, pero en los tratamientos con 15, 30 y 45 g L⁻¹ la supervivencia fue 90, 83 y 66.5 % más alta que el testigo, respectivamente, aunque con 30 y 45 g L⁻¹ hubo una reducción gradual en la altura de las plantas (Figura 1B).

ANOVA was performed and means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$) using SPSS v. 11.5 for Windows.

RESULTS AND DISCUSSION

The osmoregulators negatively affected survival and growth of plantlets. This was accentuated when concentrations of these compounds increased (Table 1). The treatments with 15, 30 and 45 g L⁻¹ manitol had survival percentages of 80, 70 and 43 %. There were no significant differences in number of shoots among the assessed concentrations of manitol. However, 30 and 45 g L⁻¹ manitol caused significant differences in shoot length, number of leaves, and root number and length (Figure 1A). In the treatments with sorbitol, results were similar. With 15, 30 and 45 g L⁻¹, survival was 90, 83 and 66.5 % higher than the control, respectively, although with 30 and 45 g L⁻¹, there was a gradual reduction in plant height (Figure 1B).

These results are similar to those observed by Skalova *et al.* (2012) during *in vitro* conservation of yakon (*Smilacina sonchifolius*), except that the concentration of sorbitol and manitol in MS medium was 10 and 20 g L⁻¹. With potato (*Solanum tuberosum* L.), 40 g L⁻¹ sorbitol in 50 % MS medium affected number of shoots and plant height

Cuadro 1. Efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento sobre la conservación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* sp.).

Table 1. Effect of osmoregulators and growth inhibitors on *in vitro* conservation of sugarcane (*Saccharum* sp.).

Tratamiento	Dosis	Supervivencia (%)	Número de brotes	Longitud de plántula (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíz (cm)
Testigo	0	100	2.8 ± 0.26 cd	9.3 ± 0.50 a	6.5 ± 0.44 a	8.7 ± 0.54 a	3.6 ± 0.22 a
Manitol (g L ⁻¹)	15	80	2.2 ± 0.45 d	8.5 ± 0.42 ab	4.2 ± 0.36 bc	8.2 ± 0.52 a	2.3 ± 0.16 de
	30	70	1.8 ± 0.26 d	6.5 ± 0.26 cd	3.2 ± 0.40 cd	4.1 ± 0.63 b	2.4 ± 0.19 de
	45	43	1.7 ± 0.31 d	5.1 ± 0.29 de	3.2 ± 0.16 cd	2.6 ± 0.26 b	2.3 ± 0.18 de
Sorbitol (g L ⁻¹)	15	90	2.6 ± 0.37 cd	9.5 ± 0.51 a	5.3 ± 0.53 ab	9.3 ± 0.59 a	3.1 ± 0.20 abcd
	30	83	2.1 ± 0.39 d	5.0 ± 0.65 de	4.3 ± 0.46 bc	4.7 ± 0.49 b	2.2 ± 0.21 de
	45	66.6	1.7 ± 0.27 d	5.0 ± 0.46 de	3.1 ± 0.26 cd	3.6 ± 0.55 b	2.2 ± 0.23 de
PAC (mg L ⁻¹)	1	100	3.8 ± 0.35 bc	5.7 ± 0.34 cd	4.3 ± 0.28 bc	8.6 ± 0.57 a	3.5 ± 0.35 ab
	2	100	4.8 ± 0.32 ab	3.5 ± 0.13 ef	4.3 ± 0.26 bc	7.6 ± 0.45 a	2.6 ± 0.06 cde
	3	100	5.4 ± 0.33 a	3.0 ± 0.13 f	5.2 ± 0.27 ab	7.3 ± 0.40 a	2.7 ± 0.08 bcde
ABA (mg L ⁻¹)	1	80	2.1 ± 0.29 d	7.1 ± 0.39 bc	3.5 ± 0.26 cd	4.7 ± 0.49 b	3.4 ± 0.1 abc
	2	73	1.3 ± 0.18 d	5.6 ± 0.32 cd	3.8 ± 0.12 bcd	4.1 ± 0.39 b	2.6 ± 0.10 bcde
	3	53	1.4 ± 0.17 d	3.1 ± 0.20 f	2.5 ± 0.24 d	2.5 ± 0.24 b	1.8 ± 0.10 e

Los valores representan la media ± EE (error estándar). Medias con letras distintas entre columnas son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Values represent mean ± SE (standard error). Means with different letters in a column are statistically different ($p \leq 0.05$).

Resultados similares fueron observados por Skalova *et al.* (2012) durante la conservación *in vitro* de yacón (*Smallanthus sonchifolius*), excepto que la concentración de sorbitol y manitol fue 10 y 20 g L⁻¹ en medio MS. En papa (*Solanum tuberosum* L.) con 40 g L⁻¹ de sorbitol en medio MS al 50 % de su concentración afectó el número de brotes y la altura de las plantas (Iciobanu y Constantinovici, 2012). En ajo (*Allium sativum* L.) Hassan *et al.* (2007) reportan una reducción del crecimiento y mayor número de raíces en plantas tratadas con 36.5 y 72.8 g L⁻¹ de sorbitol. Según Sarwar y Siddiqui (2004), 10 g L⁻¹ de manitol mejora la sobrevivencia *in vitro* de la variedad Katha. Este comportamiento se puede explicar por los mecanismos de la caña de azúcar para metabolizar los azúcares alcoholes como el manitol y sorbitol, que a bajas concentraciones puede favorecer el desarrollo de las plantas (Lemos *et al.*, 2002). Un

(Iciobanu and Constantinovici, 2012). With garlic (*Allium sativum* L.), Hassan *et al.* (2007) reported a reduction in growth and higher number of roots in plants treated with 36.5 and 72.8 g L⁻¹ sorbitol. According to Sarwar and Siddiqui (2004), 10 g L⁻¹ manitol improve *in vitro* survival of the sugarcane variety Katha. This behavior may be explained by the plant's mechanisms for metabolizing alcohol sugars such as manitol and sorbitol that, at low concentrations, can favor plant development (Lemos *et al.*, 2002). An increase in *in vitro* manitol concentrations affects survival and plant height of the sugarcane variety C87-51 (García *et al.*, 2004). In our study, there were no differences ($p>0.05$) in number of shoots among the different concentrations of manitol, but there was a negative effect on plant height when the concentration of this osmoregulator was 30 g L⁻¹.

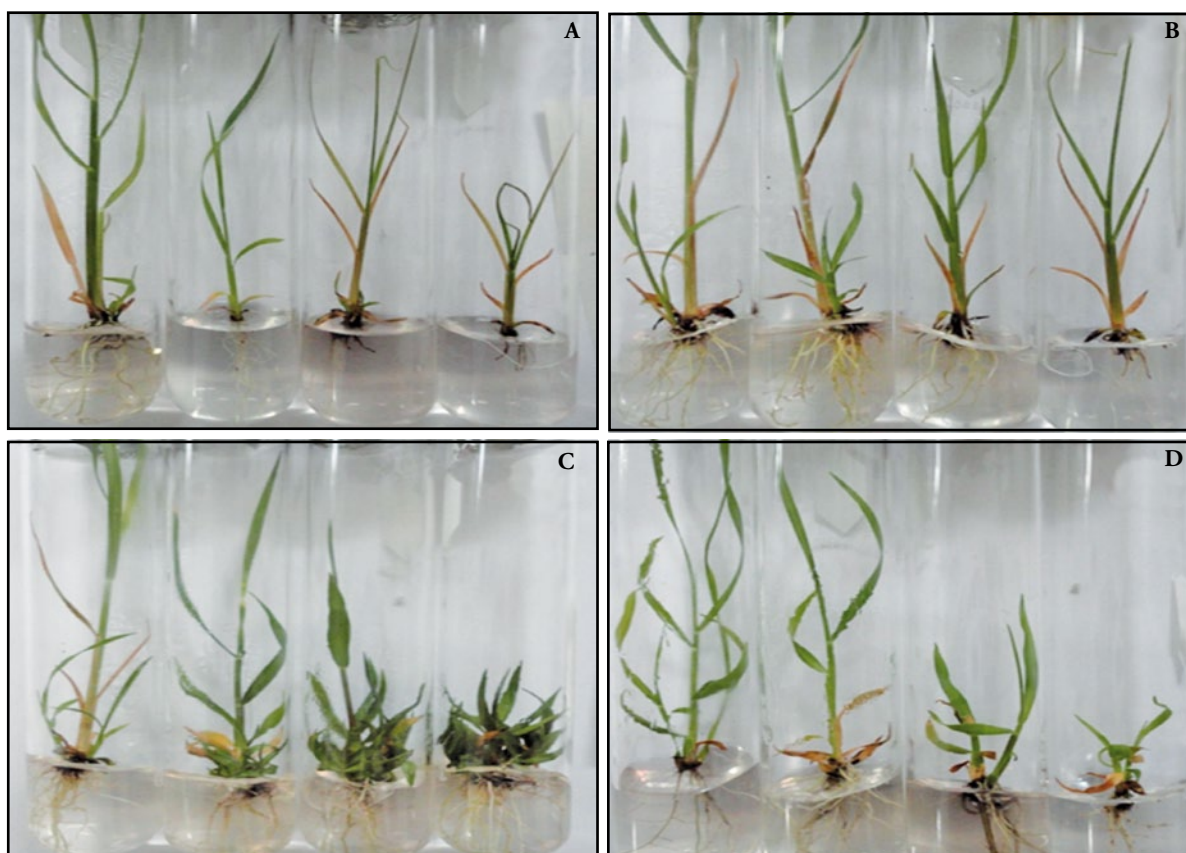


Figura 1. Conservación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Dosis: A) manitol 0, 15, 30 y 45 g L⁻¹; B) sorbitol 0, 15, 30 y 45 g L⁻¹; C) paclobutrazol 0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹; D) ácido abscísico 0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹.

Figure 1. *In vitro* conservation of sugarcane (*Saccharum* sp.). Dosage: A) manitol 0, 15, 30 and 45 g L⁻¹; B) sorbitol 0, 15, 30 and 45 g L⁻¹; C) paclobutrazol 0, 1, 2 and 3 mg L⁻¹; D) abscisic acid 0, 1, 2 and 3 mg L⁻¹.

aumento en las concentraciones de manitol *in vitro* afectan la supervivencia y la altura de las plantas de caña de azúcar variedad C87-51 (García *et al.*, 2004). En este estudio no hubo diferencias ($p > 0.05$) en el número de brotes utilizando diferentes concentraciones de manitol, pero hubo un efecto negativo sobre la altura de las plantas al aumentar a 30 g L^{-1} las concentraciones de este osmoregulador.

Todos los tratamientos con PAC mostraron 100 % de supervivencia, aunque hubo diferencias significativas en número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas y longitud de las raíces. Los brotes obtenidos en los tratamientos con PAC mostraron una coloración verde intenso y un aspecto vigoroso durante su cultivo (Figura 1C), debido probablemente a la relación entre el PAC y la acumulación de clorofila causado por la reducción de la elongación celular (Fletcher y Gilley, 2000).

Los tratamientos con 1, 2 y 3 mg L^{-1} de ABA causaron 80, 73 y 53 % de supervivencia. Las variables longitud de los brotes, número de hojas, número y longitud de las raíces mostraron diferencias significativas, aunque la longitud de raíces no cambió significativamente (Figura 1D).

In vitro, PAC induce procesos de morfogénesis en el CTV. Lorenzo *et al.* (1998), al establecer un protocolo para la formación de brotes de caña de azúcar variedad C-1051-73 con un sistema de inmersión temporal, observaron que la adición de 1 mg L^{-1} de PAC aumentó el número de brotes por explante. Moosikapala y Te-chato (2010) evaluaron *in vitro* la conservación de brotes de pasto vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash.) y encontraron que 3 mg PAC L^{-1} causaron un mayor número de brotes a los 12 meses de cultivo.

Según Gopal *et al.* (2005), el crecimiento *in vitro* de papa se redujo al adicionar $2.11 \text{ mg ABA L}^{-1}$, mientras que Keatmetha *et al.* (2006) reportan que 1 mg ABA L^{-1} redujo el crecimiento de mangostán (*Garcinia mangostana*) sin afectar la supervivencia y el número de brotes por explante *in vitro*. Barrueto y Carvalho (2008) observaron que 5 y $8 \text{ mg de ABA L}^{-1}$ *in vitro* reducía el número y la longitud de los brotes de la yuca (*Manihot esculenta* Grantz), lo que sugería que estas concentraciones son adecuadas para la inducción *in vitro* de la dormancia de brotes de esta especie. El ABA impacta varios procesos fisiológicos de las plantas y uno relevante es el cierre de estomas, el cual puede disminuir la capacidad fotosintética y

All of the PAC treatments had 100 % survival, although there were significant differences in number of shoots, shoot length, number of leaves and root length. The shoots obtained in the PAC treatments exhibited intense green coloring and a vigorous aspect during their culture (Figure 1C). This is likely due to the relationship between PAC and the accumulation of chlorophyll caused by a reduction in cell elongation (Fletcher and Gilley, 2000).

The treatments with 1, 2 and 3 mg L^{-1} ABA caused 80, 73 and 53 % survival. The variables shoot length, number of leaves, and root number and length showed significant differences, although root length did not change significantly (Figure 1D).

In vitro, PAC induces morphogenetic processes in the CTV. Lorenzo *et al.* (1998), when establishing a protocol for shoot formation with the sugarcane variety C-1051-73 in a system of temporary immersion, observed that the addition of 1 mg L^{-1} PAC increased the number of shoots per explant. Moosikapala and Te-chato (2010) evaluated *in vitro* conservation of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* Nash.) shoots and found that 3 mg L^{-1} PAC caused a higher number of shoots at 12 months of culture.

According to Gopal *et al.* (2005), *in vitro* growth of potato decreased when $2.11 \text{ mg ABA L}^{-1}$ was added to the medium, while Keatmetha *et al.* (2006) reported that 1 mg ABA L^{-1} reduced *in vitro* growth of mangosteen (*Garcinia mangostana*) without affecting survival or number of shoots per explant. Barrueto and Carvalho (2008) observed that 5 and 8 mg ABA L^{-1} *in vitro* reduced number and length of cassava (*Manihot esculenta* Grantz) shoots, suggesting that these concentrations are adequate for inducing *in vitro* dormancy in this species. ABA impacts several physiological processes of plants. One relevant process is stoma closing, which can decrease photosynthetic capacity and, thus, plant growth. In addition, an increase in ABA concentration alters hormonal balance, producing negative effects on cell growth and differentiation (Swamy and Smith, 2005; Rai *et al.*, 2011). One application of ABA is *in vitro* conservation due to its effect in delaying plant growth Rai *et al.*, 2011).

In our study, the osmotic agents assessed and ABA decreased survival percentages as their concentration increased in the culture medium. This effect, however, was not observed with the use of PAC. In this respect, Jaleel *et al.* (2007) point out that, *in vitro*, plants treated

reducir el crecimiento vegetal. Adicionalmente, un incremento en la concentración de ABA altera el balance hormonal, provocando efectos negativos en el crecimiento y diferenciación celular (Swamy y Smith, 2005; Rai *et al.*, 2011). Una aplicación de ABA es la conservación *in vitro*, lo cual se debe a su efecto de retardar el crecimiento vegetal (Rai *et al.*, 2011).

En el presente estudio, los agentes osmóticos evaluados y el ABA disminuyeron los porcentajes de supervivencia a medida que aumentaba su concentración en el medio de cultivo, pero este efecto no fue observado al utilizar PAC. Al respecto, Jaleel *et al.* (2007) señalan que, *in vitro*, las plantas tratadas con este compuesto presentan ventajas adaptativas a ciertas condiciones desfavorables como la tolerancia a temperaturas extremas, sequía, salinidad y ataque por patógenos. Por ello, triazoles como el PAC son considerados como agentes protectores a estrés abiótico (Fletcher y Gilley, 2000) y su uso, a diferencia del manitol, sorbitol y ABA, puede ser una alternativa nueva para la conservación *in vitro* de germoplasma de este importante cultivo porque en condiciones normales, en un medio MS sin osmorreguladores e inhibidores del crecimiento, esta especie debe ser transferida a medio fresco cada 45 d.

Los brotes sobrevivientes en todos los tratamientos produjeron raíces y mostraron 95 % de supervivencia durante la etapa de aclimatización. Las vitroplantulas aclimatadas tuvieron un aspecto vigoroso (Figura 2A) y se desarrollaron normalmente cuando fueron transferidas al suelo (Figura 2B).

CONCLUSIONES

Las plantas de caña de azúcar variedad Mex 69-290 fueron conservadas *in vitro* bajo condiciones de lento crecimiento causado por paclobutrazol, el cual retardó el crecimiento sin afectar la supervivencia. Por lo tanto, este sistema permite mantener colecciones de germoplasma viable con una mínima inversión de tiempo y recursos, manteniendo subcultivos cada 180 d.

Las plántulas conservadas *in vitro* pueden ser transferidas a medio de multiplicación para obtener una fuente ilimitada de material vegetal requerido para el establecimiento de un semillero básico, intercambio de germoplasma o programas de mejoramiento genético.

with this compound present adaptive advantages for survival in certain unfavorable conditions, such as tolerance to extreme temperatures, drought, salinity and attack by pathogens. For this reason, triazoles like PAC are considered protective agents against abiotic stress (Fletcher and Gilley, 2000), and its use, unlike manitol, sorbitol and ABA, may be a new option for use in *in vitro* germplasm conservation of this important species since under normal conditions in MS medium without osmoregulators or growth inhibitors, it must be transferred to fresh medium every 45 d.

The surviving shoots in all of the treatments produced roots and, during the acclimatization stage, there was 95 % survival. The acclimatized vitroplantlets were vigorous in aspect (Figure 2A) and they developed normally when transplanted to soil (Figure 1B).

CONCLUSIONS

Sugarcane plants, variety Mex 69-290, were conserved *in vitro* under conditions of slow growth caused by paclobutrazol, which delayed growth without affecting survival. Therefore, with this system, viable germplasm collections can be maintained with low investments of time and resources, with subcultures every 180 d.

Plantlets conserved *in vitro* can be transferred to multiplication medium to obtain an unlimited source of plant material required for basic seedbed, germplasm exchange, or genetic improvement programs.

—End of the English version—

---*---

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Biol. Estefani García-Rodríguez por su apoyo técnico en laboratorio. Al Colegio de Postgraduados Campus Campeche por el financiamiento otorgado a través de la Línea Prioritaria de Investigación 5 Biotecnología microbiana, vegetal y animal.

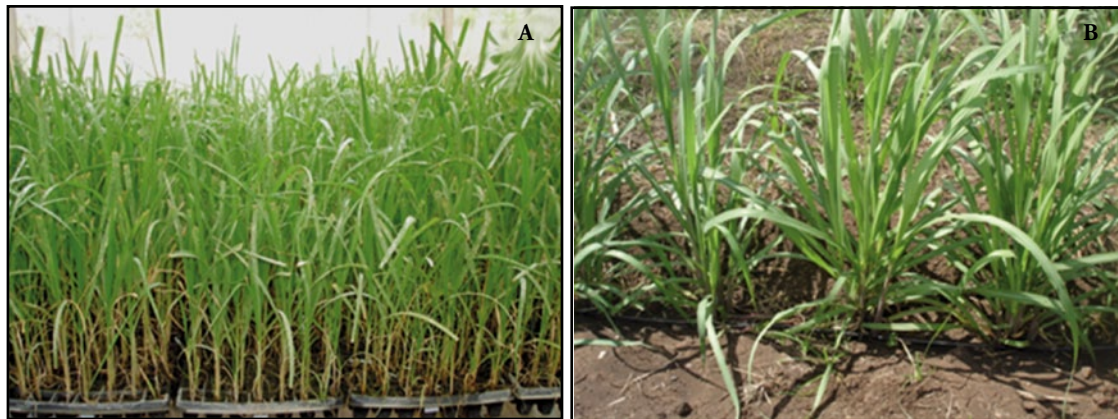


Figura 2. Plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) *ex vitro*. A) aclimatación y B) trasplante en campo.
Figure 2. *Ex vitro* sugarcane (*Saccharum* sp.) plants. A) acclimatization and B) transplanted to field.

LITERATURA CITADA

- Barrueto, L. P., and L. L. C. B. Carvalho. 2008. Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculentus*). Chilean J. Agric. Res. 68: 304-308.
- Fletcher, R. A., and A. Gilley. 2000. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Hort. Rev. 24: 55-138.
- Flores, C. S. 2001. Las Variedades de Caña de Azúcar en México. Ed. ATAM. México. 308 p.
- García, L. A., J. N. Pérez, M. U. Rodríguez, B. Pérez, Y. P. Martínez, y Z. H. Sarria. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. Biot. Veg. 4: 101-105.
- González-Arno, M. T., C. Urra, F. Engelmann, R. Ortiz, and C. De-La-Fe. 1999. Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: Effect of storage temperature and storage duration. Cryo-Lett. 20: 347-352.
- Gopal, J., A. Chamail, and D. Sarkar. 2005. Use of microtubes for slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm. Plant Gen. Res. Newsl. 141: 56-60.
- Hassan, N. A., A. A. El-Halwagi, A. Gaber, M. El-Awady, and A. Khalaf. 2007. Slow-growth *in vitro* conservation of garlic cultivars growth in Egypt: Chemical characterization and evaluation molecular. Global J. Mol. Sci. 2: 67-75.
- Iciobanu, I. B., and D. Constantinovici. 2012. The effect of sorbitol and conservation period on the *in vitro* evolution of *Solanum tuberosum* L. Plantlets. Cercetari Agronomice Moldova 45: 79-83.
- Jaleel, C., P. Manivannan., B. Sankar, and A. Kishorekumar. 2007. Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. Acta Physiol. Plant. 29: 205-209.
- Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores del Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. Propiedades y Acción. Mundi-Prensa. México, D. F. 488 p.
- Jiménez E., J. Pérez, V. Gil, J. Herrera, I. García, y E. Alonso. 1995. Sistema para la propagación de la caña de azúcar. In: Estrada M, Riego E, Limonta E, Tellez P, y J. Fuente (eds). Avances en Biotecnología Moderna. Ed. Elfos Scientiae. Cuba 3: 11.2.
- Keatmetha, W., P. Suksa-Ard, M. Mekanawakul, and S. Te-Chato. 2006. *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium dosmesticum* Corr. Walailak J. Sci. Tech. 3: 33-50.
- Lemos, E. E., M. Ferreira, L. M. Calheiros, C. E. Ramalho, and M. Albuquerque. 2002. Conservación *in vitro* de germoplasma de caña de azúcar. Pesq. Agropec. Bras. 47: 1359-1364.
- Lorenzo, J. C., L. B. González, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa, and C. Barroco. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell Tissue Organ Cult. 54: 197-200.
- Moosikapala, L., and S. Te-chato. 2010. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. J. Agric. Technol. 6: 401-407.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Pence, V. C., J. A. Sandoval, V. M. Villalobos, and F. Engelmann. 2002. *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. IPGRI Tech. Bull. No. 7. 87 p.
- Rai, M. K., N. S. Shekhawat, Harish, A. K. Gupta, M. Phulwaria, K. Ram, and U. Jaiswal. 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. Plant Cell Tissue Organ Cult. 106: 179-190.
- Sarasan, V. R., M. M. Cripps, C. Ramsay, M. Atherton, G. McMichen, J. K. Prendergast, and J. K. Rowntree. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 42: 206-214.
- Sarwar, M., and S. U. Siddiqui. 2004. *In vitro* conservation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) germplasm. Pak. J. Bot. 36: 549-556.
- Skalova, I., I. Viehmannova, and J. Vitamvas. 2012. *In vitro* conservation of *Smilax sonchifolius* under slow-growth conditions. Agr. Trop. Subtrop. 45: 147-150.
- Swamy, P. M., and B. N. Smith. 2005. Role of abscisic acid in plants stress tolerance. Curr. Sci. 76: 1220-1227.
- Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Hort. Rev. 24: 1-30.