

INCREMENTO DE LA EFICIENCIA EN LA MICROPROPAGACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM SPP HIBRIDO*) EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Jorge Luis Montes de Oca Súarez¹, Novisel Veitia-Rodríguez², Aydiloide Bernal¹, Pablo Machado¹, Mayra Jiménez¹, Zenaida Occeguera¹, Carlos Reyes¹, Ana Rosa Hernández¹, Irenaldo Delgado¹, Ariel Arencibia¹, Ignacio Santana¹, Elio Jiménez²

1 Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos. Autopista Nacional km 246. Ranchuelo, Villa Clara, Cuba. biofabrica@vc.minaz.cu

2 Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, CP 54 830. Villa Clara, Cuba. ejimenez@ibp.co.cu

Introducción

El presente trabajo tuvo como finalidad mejorar la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* de la caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal (SIT). Se realizaron una serie de experimentos donde se estudió la influencia de la presión de aire sobre composición de la atmósfera gaseosa en los SIT, la posibilidad de eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT, y el efecto combinado de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo. De estos estudios se obtuvo que en la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo) se logró un mejor desarrollo morfológico de las plantas y un incremento en los coeficientes de multiplicación, así como una mayor sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatización. Igualmente se demostró que es posible eliminar la fase de elongación realizando el último subcultivo de multiplicación en medio sin PBZ, lo que permite reducir el tiempo en el esquema de propagación y a la vez incrementar la calidad de las plantas producidas. Con la combinación de la densidad de inóculo de 40 brotes por vaso de cultivo y un tiempo de cultivo de 50 días se logra una mejor utilización de la capacidad del vaso de cultivo y la producción de un mayor número de plantas por SIT, que en términos productivos significa un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada, permitiendo manejar un mayor número de explantes por área física de las cámaras de cultivo. El escalado productivo realizado en 3 variedades en la Biofábrica del Ingenio Santa Ana en la República de Guatemala, en la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (Cuba) y en la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez”, del Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste (Pernambuco, Brasil) validó los resultados obtenidos en la presente investigación.

Materiales y Métodos

Como material vegetal inicial se utilizaron ápices meristemáticos de tres variedades de caña de azúcar (CP72 2086, Mex79 431 y la RB73 2577). Los procedimientos para el establecimiento y el cultivo *in vitro* se desarrollaron según la metodología propuesta por Jiménez et al. (1995), para la micropropagación de la caña de azúcar. Los explantes fueron cultivados en frascos de 250 ml, añadiéndoseles 25 ml de medios de cultivos. Para el montaje de los experimentos en los SIT se utilizaron frascos de polipropileno (NALGENE) de 10 litros, los que contenían 4 litros de medio de cultivo y clústeres de 2 a 3 brotes con más de 1.0 cm de altura, en segundo subcultivo de multiplicación (de Feria et al., 2002).

- **Influencia de la presión de aire en los SIT sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas *in vitro***

Se compararon dos configuraciones de SIT para estudiar la influencia que ejerce la presión de aire que queda en los frascos después de la inmersión sobre los parámetros morfológicos de las plantas cultivadas *in vitro*. La primera variante es la utilizada por Lorenzo et al., (1998, 2000), a la segunda variante se le añadió una tercera válvula

Solenoide de $\frac{3}{4}$ " con el objetivo de liberar la presión de aire en los frascos como se muestra en la Figura 4 (II). Las variantes contaron con 9 réplicas por SIT cada una.

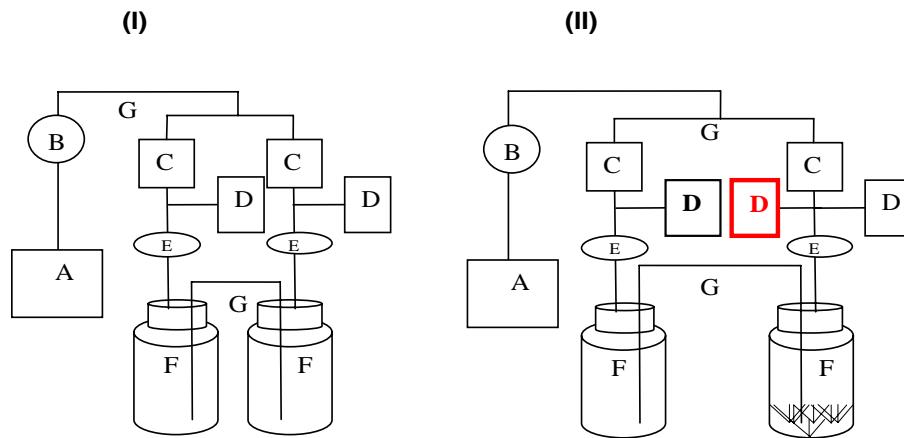


Figura 1. Diagrama de las dos configuraciones de SIT empleadas, sistemas de inmersión temporal con presión, A: Compresor, B: Manómetro, C: Válvulas de entrada de aire, D: Válvulas de salida del aire, E: Filtros Milipore, F: Frascos, G: Mangueras de Silicona, sistemas de inmersión temporal sin presión, A: Compresor, B: Manómetro, C: Válvulas de entrada de aire, D: Válvulas de salida del aire, E: Filtros Milipore, F: Frascos, G: Mangueras de Silicona

- Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT**

Se evaluaron dos tratamientos para estudiar la posibilidad de eliminar la fase de elongación de la caña de azúcar en los SIT, el primero fue el protocolo descrito por Lorenzo *et al.*, (1998), figura 5 (A). En el segundo tratamiento se empleó el medio de cultivo de multiplicación con MS + 0.6 mg.L⁻¹ de 6-BAP, 0 mg.L⁻¹ de PBZ, con transferencia directa a la fase de enraizamiento, utilizando el medio de cultivo propuesto por Jiménez, (1995) y fueron montadas 9 réplicas en cada tratamiento. En la figura 5 (B) se muestra el esquema utilizado para el experimento con los SIT.

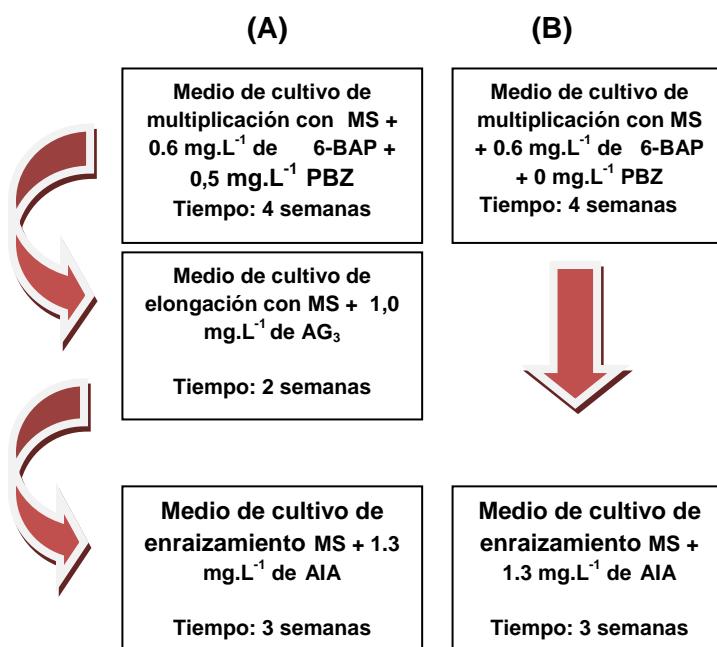


Figura 2. Comparación de dos procedimientos de propagación en los sistemas de inmersión temporal, A: SIT con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de PBZ en el medio de multiplicación y fase de elongación, B: SIT sin PBZ en el medio de multiplicación y transferencia directa a enraizamiento

Resultados y Discusión

Como se aprecia en la tabla 1 la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo), donde el último subcultivo de multiplicación se realizó sin adicionar PBZ al medio de cultivo, la combinación de la densidad de inóculo de 40 brotes por vaso de cultivo, un tiempo de cultivo de 50 días y elimino la fase de elongación, indujo a un mejor desarrollo morfológico de las plantas, mayores coeficientes de multiplicación, mejor utilización de la capacidad del vaso de cultivo, mayor número de plantas por SIT, que en términos productivos significa un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada, permitiendo manejar un mayor número de explantes por área física de las cámaras de cultivo. Con este manejo fue posible reducir el tiempo en el esquema de propagación y a la vez incrementar la calidad de las plantas producidas y su posterior sobrevivencia en la fase de aclimatación.

Tabla 1. Efecto de la presión de aire en los SIT sobre la morfología de las plantas producidas

SIT con presión	\bar{X}	E.E	Rangos medios	SIT sin presión	\bar{X}	E.E	Rangos medios
Longitud del Tallo (cm)	8.9 ± 0.11		47.00 b	Longitud del Tallo (cm)	12.8 ± 0.17		124.00 a
Grosor del tallo (mm)	0.4 ± 0.012		59.50 b	Grosor del tallo (mm)	0.5 ± 0.010		111.50 a
Ancho de las hojas	0.3 ± 0.008		54.00 b	Ancho de las hojas	0.5 ± 0.015		117.00 a
% de plantas con raíz/SIT	55.6 ± 0.26		46.00 b	% de plantas con raíz/SIT	62.5 ± 0.26		125.00 a
Número de hojas	3.2 ± 0.04		81 n.s.	Número de hojas	3.3 ± 0.05		90 n.s.
Longitud de las hojas	11.5 ± 0.14		64 n.s.	Longitud de las hojas	12.7 ± 0.11		107 n.s.
% de plantas deformadas/SIT	2.29 ± 0.03		124.00 a	% de plantas deformadas/SIT	1.55 ± 0.02		47.00 b

*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

El efecto directo de la presión de aire en los vasos de cultivo sobre las células y tejidos de plantas cultivadas en medios de cultivo líquidos aún no ha sido esclarecido, aunque se reconoce que el incremento de la misma puede afectar la morfología de las células y tejidos. En los SIT la presión de aire sobre el contenido de oxígeno en la atmósfera no deber ser el factor primario responsable de los cambios en la morfología de las plantas (Curtis, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento probablemente tengan su mejor explicación en la composición de otros gases como el etileno y el CO₂ que se logra en las dos configuraciones de SIT ensayadas. El ambiente gaseoso dentro de los vasos de cultivo

sin intercambio es anormal en comparación con el ambiente *ex vitro*. Las principales características del ambiente *in vitro* son la elevada humedad relativa, las fluctuaciones diurnas en la concentración de CO₂ y la acumulación de etileno y otras sustancias tóxicas (Kubota y Kozai, 1992). Como consecuencia de ello la fotosíntesis, la transpiración y la toma de agua, nutrientes y CO₂ pueden ser reprimidas y se estimula la respiración, lo que resulta en un pobre crecimiento (Jeong et al., 1995) y la aparición de desórdenes fisiológicos y morfológicos en las plantas *in vitro* (Debergh y Maene, 1984), por lo que el objetivo principal de ventilar los vasos de cultivo es mejorar el ambiente gaseoso y minimizar las diferencias entre el ambiente *in vitro* y el *ex vitro*.

Al comparar el tratamiento con eliminación de la etapa de elongación con el protocolo descrito por Lorenzo *et al.*, (1998) para la propagación de caña de azúcar en los SIT, los mejores resultados en cuanto al número total de plantas producidas por SIT y el coeficiente de multiplicación se lograron en este último. Estas diferencias deben estar dadas por la presencia de PBZ como regulador del crecimiento utilizado en el medio de cultivo de multiplicación propuesto por Lorenzo *et al.*, (1998). Este compuesto químico se encuentra entre los compuestos triazólicos inhibidores de la síntesis de giberelina, los que han sido utilizados ampliamente en la agricultura para el control del crecimiento de las plantas, así como para lograr la disminución de la longitud y número de raíces (Aron et al., 1985; Early y Martín., 1988); Beausher y Yelenosky., 1987). Las plantas con mejores caracteres morfológicos se desarrollaron en los SIT cuando no se utilizó PBZ en el medio de cultivo de multiplicación y se eliminó la fase de elongación, tal como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT y su influencia sobre las características morfológicas de las plantas propagadas

Con fase de elongación	\bar{X}	E.E	Rangos medios	Sin fase de elongación	\bar{X}	E.E	Rangos medios
Longitud del Tallo (cm)	12.8 ±0.17		45.0 b	Longitud del Tallo (cm)	17.5 ±0.14		126.0 a
Grosor del tallo (cm)	0.6 ±0.010		59.0 b	Grosor del tallo (cm)	07 ±0.012		112.5 a
Ancho de las Hojas (cm)	0.5 ±0.015		54.0 b	Ancho de las Hojas (cm)	0.7 ± 0. 011		117.0 a
Número de hojas	3 ±0.05		55.5 b	Número de hojas	4 ±0.08		115.5 a
Longitud de las hojas	15.5 ±0.17		64.0 b	Longitud de las hojas	19.8 ±0.14		107.0 a
% de plantas con raíz/SIT	62.2 ±0.26		45.00 b	% de plantas con raíz/SIT	95.0 ± 0.34		126.00 a
% de plantas deformadas/SIT	1.6 ±1.06		126.00 a	% de plantas deformadas/SIT	0.22 ±0.34		45.00 b

*Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de Mann Whitney

Se realizó el escalado de la propagación en SIT, aplicando los mejores resultados obtenidos (configuración de SIT con liberación de la presión, eliminación de la fase de elongación y densidad de inóculo de 40 explantes y 50 días de cultivo) en tres genotipos de caña de azúcar: la variedad CP72 2086 con la cual se realizaron los ensayos previos y las variedades RB73 2577 y Mex79 431, además fueron generalizados estos resultados con la introducción de estas mejoras en el proceso de propagación en la Biofábrica “Gobernador Miguel Arráez”, perteneciente al Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste, Pernambuco, Brasil y la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Cuba), durante las campañas 2007 - 2008 y 2008 – 2009, permitiendo esto elevar las cantidades de semilla disponibles para la producción azucarera de estos países. Como ejemplo en la figura 4 se muestran algunos de estos resultados.

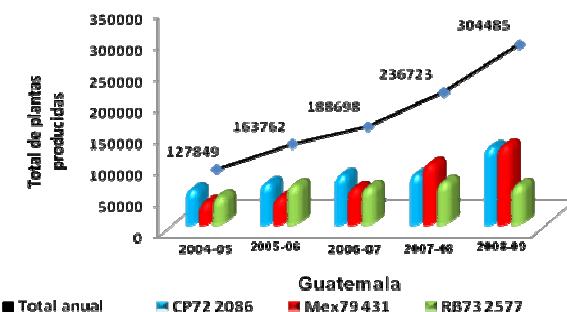


Figura 4. Producción de plantas de caña de azúcar en SIT en la Biofábrica del Ingenio Santa Ana en Guatemala, correspondientes a los años 2004 al 2009

Los resultados obtenidos permiten concluir que la combinación de la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo), la eliminación de la fase elongación y los ajustes en la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo condujo al logro de mejores resultados productivos, puesto que a partir de los años en que se comenzó la introducción de las mejoras tecnológicas se produjo un incremento considerable del total de plantas obtenidas por SIT, así como mejores rendimientos biológicos, por lo que se considera que estos resultados pueden ser utilizados para la producción de plantas vía organogénesis a escala masiva en otros genotipos de caña de azúcar, ofreciendo la posibilidad de una mayor automatización de algunas etapas del proceso de micropagación.

Referencias

1. Curtis W. Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp.21-40, 2005.
2. Albany N, Vilchez J, Jiménez E, García L, de Feria M, Pérez N, Sarría Z, Pérez B, Clavelo J. Use of growth retardants 14 for banana (*Musa AAA* cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds)

- Liquid Cultutre Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 213-224. Springer, Dordrecht, (2005).
3. Jiménez E. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba. pp.40-52, 1995.
 4. Lorenzo J C, Gonzalez B L, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:197–200, 1998.
 5. Lorenzo J C. Micropagación de la caña de azúcar en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplantas. UNICA, 2000.
 6. de Feria M, Jiménez E, Chávez M. Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum spp.* var. IBP 89-112. *Biotecnología vegetal Vol. 2, No. 3: 143-147, julio-septiembre*, 2002.