

TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y PUESTA EN MARCHA DE LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS BIOLAB, TECNOLOGÍA VEGETAL LTDA DE BRASIL.

Aydiloide Bernal Villegas¹, Pablo Machado Armas¹, Leidy Cortegaza Avila², José Barbosa Cabral³, Ignacio Santana Aguilar⁴, Jorge Montes de Oca Suárez¹ e Irenaldo Delgado Mora¹

1. *Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos (ETICA). Cuba*
2. *Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Jovellanos (EPICA). Cuba*
3. *Laboratorio de Cultivo de Tejidos, BIOLAB, Tecnología Vegetal, LTDA (BIOLAB, Tecnología Vegetal). Brasil.*
4. *Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Cuba*

Autopista Nacional Km. 246. Ranchuelo. Villa Clara.

E-mail: biofabrica@vc.minaz.cu

INTRODUCCIÓN.

El trabajo de este laboratorio estaba basado en la utilización de tecnología convencional de cultivo de tejidos, la cual es muy costosa y de baja productividad, por lo que los costos de producción eran muy elevados. Lo cual fue solucionado con la implementación y puesta en marcha de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Adicionalmente se hicieron otros cambios tecnológicos como son: se sustituyó la esterilización física por la química tanto para el trabajo en el flujo laminar como para la elaboración de los medios de cultivo, se implantaron dos nuevas variedades de banano utilizando la metodología del INICA, se corrigieron problemas de manejo *in vitro* del banano, caña de azúcar y piña, lográndose mejorar la calidad y comportamiento de los explantes, lo cual trajo consigo un aumento del coeficiente de multiplicación y por tanto un incremento del material en las cámaras de crecimiento.

Se inició el contrato No 29-06ATO11-09311 de asistencia técnica entre la Empresa de Ingeniería y Servicios Técnicos Azucareros (TECNOAZUCAR) de Cuba y la empresa BIOLAB, Tecnología Vegetal LTDA", Iputinga, Recife, Pernambuco, Brasil con el objetivo de realizar el montaje de los Sistemas de Inmersión Temporal y su puesta en marcha para el cultivo del Banano e introduciendo mejoras tecnológicas en el proceso de micropropagación ya implantados anteriormente. Para lo cual se realizó un diagnóstico de la Biofábrica, así como su situación productiva

El servicio comenzó a partir del 30 de mayo del 2006. A la llegada a la Biofábrica me reuní con su Director Técnico para la coordinación del trabajo a desarrollar de acuerdo con lo contratado.

El interés del Director Técnico de la Biofábrica era la instalación y puesta en marcha de los Sistemas de Inmersión Temporal para la producción de Banano, así como mejorar la metodología de propagación del mismo, pues estaba presentando problemas en el establecimiento del material inicial, por lo cual las perdidas en esta etapa eran muy grandes. Además de hacer un diagnóstico para ver todas las dificultades que debían ser corregidas, sobre todo la esterilización por el alto costo de la energía eléctrica.

ANTECEDENTES.

El trabajo de este laboratorio estaba basado en la utilización de tecnología convencional de cultivo de tejidos, la cual es muy costosas y de baja productividad, por lo que los costos de producción eran muy elevados y la calidad del producto final, debido alto consumo de energía eléctrica que encarecía mas el costo final del producto (*vitroplantas* salidas de la casa de adaptación) no satisfacían las necesidades que demandaba, así como la baja productividad de sus operarias y problemas en el establecimiento del

material inicial de banano, por lo cual las perdidas en esta etapa eran muy grandes, comenzando nuestro trabajo con la realización de un levantamiento de las principales dificultades que entorpecían el buen funcionamiento del laboratorio. Lo cual sería solucionado con la implementación y puesta en marcha de los Estantes de Inmersión para la producción de Banano, así como mejorar la metodología de propagación del mismo.

Una vez concluido dicho levantamiento procedimos a la elaboración y presentación del diagnóstico productivo del laboratorio.

SITUACIÓN EXISTENTE EN EL LABORATORIO.

El trabajo se inicio con un recorrido por todas las áreas de la Biofábrica, la cual fue construida por el INICA en 1996. A la misma solo se hicieron modificaciones antes de nuestra llegada en el área de medio de cultivo que se le agrando la meseta, la sala de transferencia del material, para aumentar al capacidad de la misma, se agrando la sala de lavado y pre- lavado, así como la fuente de agua para aumentar al calidad de la misma y se le incorpo grama en el área exterior para disminuir la presencia de polvo, por todo lo antes mencionado se puede decir que esta muy bien estructura y no se le sugiere cambio alguno para realizar después de nuestra llegada, pues la instalación se encuentra en excelente estado técnico. Seguidamente se comenzó a realizar todo el levantamiento de las necesidades para la instalación de los Sistemas de Inmersión Temporal para lo cual sugerimos que se debía de aumentar la intensidad de luz en el interior de la cámara, lo que se solucionó de inmediato.

Debido al a demora en la adquisición de todos los recursos, se comenzó el a realizar en diagnóstico de cada una de las áreas de trabajo para conocer a profundidad la misma.

DIAGNOSTICO DE LAS DIFERENTES AREAS DE TRABAJO

En el presente trabajo se reflejan todos los problemas técnicos encontrados en las diferentes áreas de trabajo y las propuestas inmediatas para estabilizar la capacidad productiva de la Biofábrica con el personal que labora en la misma.

BANCO DE DONANTES:

La Biofábrica no cuenta con un Banco de Matrices para el establecimiento del material, pues este es tomado de áreas ligadas al mejoramiento genético para su introducción al laboratorio (EMBRAPA, INCAPER, IAC, BINDI SIRIO), solo que para evitar los problemas de contaminación durante la etapa de establecimiento se le debe suspender el riego como minino 5 días antes de la toma del material, así como si hubo incidencia de lluvias para evitar la humedad en el mismo y disminuir los problemas de contaminación que se presentaban anteriormente.

MEDIO DE CULTIVO:

Se revisaron los medios de cultivo para cada una de la especies que se micropropagan en la Biofábrica y se le hicieron modificaciones para simplificar más los mismos.

Se modificó la forma de preparación de las soluciones Stop para facilitar una mayor rapidez en la elaboración de los medios de cultivo.

Debido al alto consumo de energía eléctrica de las autoclaves para la esterilización del medio de cultivo se sustituye la esterilización física por la esterilización química utilizando Hipoclorito de Sodio para la elaboración de los medios de cultivo, incluyendo el de los sistemas de inmersión temporal. Lo cual fue implementado sin problema alguno, donde las pérdidas por contaminación se mantienen sin alteración alguna (2%).

ÁREA ASÉPTICA:

Existe una coordinación entre el auxiliar de área aséptica y el técnico de medio de cultivo para elaboración de las cantidades de medio que se necesitan.

1. Se llevan todos los controles primarios de la producción.

2. Las operarias de flujo laminar cumplen con las normas y procedimientos de trabajo para cada uno de los cultivos, solo que no todas cumplen con la norma diaria, lo cual provoca que un retraso en el subcultivo de material.
3. Existe una correcta limpieza del área aséptica.
4. Las cabinas de flujo laminar están todas en perfecto estado técnico.

Se le realizó un cambio en el manejo del material durante la multiplicación para el caso de la caña de azúcar y el banano. Pues el primero no se individualizaba cada uno de los explantes y no se utilizaba el medio de cultivo sólido cada 3 subcultivos para darle un refrescamiento al material vegetal y por ende aumentar el coeficiente de multiplicación del mismo que se mostraba afectado antes de nuestra llegada y en el caso del banano se estableció la metodología de propagación del INICA porque el mismo presentaba problemas de alta contaminación desde su establecimiento y durante la multiplicación por su bajo coeficiente, lo cual fue solucionado con el manejo del mismo.

FASE DE ADAPTACIÓN:

- Se cumplen con las normas y procedimientos de trabajo en esta área para cada uno de los cultivos.
- Correcta organización de todas las labores que se desarrollan en la misma.
- Buena limpieza y organización de toda e área
- Identificación de cada uno de los cultivos y las variedades que se encuentran.
- El riego se realiza de acuerdo con las necesidades de cada cultivo, lo cual ha permitido un 99% de sobrevivencia.

MONTAJE Y DESARROLLO DE LOS ESTANTES PARA LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL.

A nuestra llegada comenzamos a trabajar junto al personal del laboratorio de cultivo de tejidos y el Director Técnico para realizar todo el levantamiento de las necesidades para la instalación de los Sistemas de Inmersión Temporal, contando con el diseño de la tapa y el tipo de frasco a utilizar durante en el proceso, lo cual trae consigo que sea un equipamiento de bajo costo para favorecer la tecnología. Lo cual se vio demorado por la contratación de una empresa que realizaría la compra de lo que se necesitaba, por la tanta demora de la misma se hizo necesario que junto con el Director técnico comenzáramos la localización de la unidad compresora, las mangueras de PVC, las uniones en (T)

plásticas, las mangueras de silicona así como los Timer, las válvulas solenoides, las uniones plásticas, los que fueron adquiridos aproximadamente en 15 días.



Fig. 1 Componentes utilizados para el montaje del Sistemas

Los primeros recursos comenzaron a llegar en el mes de julio: Frascos y tapas. En el mes de agosto del 2006, que es cuando se intensifica nuestro trabajo, comienzan a llegar al laboratorio los recursos y se procede a montarlos de inmediato, solo nos faltaba que se localizaran y entregaran los filtro Millipores para el filtrado del aire y el reactivo Paclobutrazol, los que no fueron recibidos hasta mediados del mes de septiembre, con lo que se nos atrasó la terminación de los estante y por ende su puesta en marcha.



Fig.2 Unidad compresora

Pues en el mes de octubre se comienzan a realizar pruebas en vacío para hacer las correcciones necesarias en cada uno de los estantes, así como para el ajuste del tiempo programado para cada una de las inmersiones. El material que se utilizaría para la inoculación de los frascos de Inmersión Temporal se preparó en la última semana de octubre con el objetivo de ver posibles contaminaciones antes de ser inoculado. Y se le dio el manejo establecido para este tipo de material.

La puesta en marcha de los mismos se realizó en el mes de noviembre con la inoculación de Banana Pacovan Ken, primeramente se realizó el montaje del primer estante y se fue escalando progresivamente hasta completar los 8 estantes y cada uno de ellos con una capacidad de 48 pares de sistemas de 10 litros, para un total de 384 pares de sistemas. Para iniciar el montaje de los mismos se necesitan 30 000 explantes cada 35 días, para mantener su correcto funcionamiento a toda capacidad, debido a que la densidad de inóculo es de 78 explantes por cada par de SIT.



Fig.3 Secuencia de operaciones: inoculación del material, crecimiento y desarrollo en los frascos y desmonte.

Durante el tiempo de espera de la localización y adquisición de los renglones que nos faltaban, nos dimos a la tarea de capacitar al personal de la Biofábrica que trabajaría en la preparación de los medios de cultivos para los SIT, los que en su composición son diferentes a los que han estado utilizando hasta el momento, en la preparación, lavado de los componentes, esterilización de los medios de cultivo y manipulación del material vegetal que sería utilizado en los Sistemas de Inmersión Temporal, en la misma participaron todos los trabajadores del laboratorio.

En las fotos se muestra como se procede al lavado de los frascos, cocinado del medio de cultivo y la dosificación del mismo.



Fig.4 Lavado de los frascos, cocinado del medio de cultivo y la dosificación.

Conclusiones:

- ✓ Con la adición de 1,0 mg.L⁻¹ de paclobutrazol (PBZ) al medio de cultivo para la propagación a través de la inmersión temporal se lograron los mayores índices de multiplicación, cuando los explantes estuvieron 5 minutos en inmersión cada 3 horas y la densidad de inóculo en frascos de 10 litros de capacidad fue de 70 explantes, con un volumen de 2800 ml de medio de cultivo, permitiendo establecer una metodología para la propagación “in vitro” de Banano utilizando los Sistemas de Inmersión Temporal.
- ✓ La instrumentación de los sistemas de inmersión temporal como nuevo sistema de propagación nos permite incrementar la capacidad productiva, además de disminuir los costo de producción por concepto de mano de obra, ahorro de energía y disminución de la contaminación
- ✓ Las plantas propagadas en los sistemas de inmersión temporal tuvieron un comportamiento superior a las procedentes de la propagación convencional (medio semisólido) en fase de aclimatación y no se observó presencia de cambios fenotípicos.

Recomendaciones:

- ✓ Aplicar la metodología establecida para la multiplicación del cultivar híbrido ‘FHIA 18’ utilizando el sistema de inmersión temporal como una vía de incrementar los coeficientes de multiplicación y la capacidad productiva de las Biofábricas.
- ✓ Extender estos estudios a otros genotipos de caña de azúcar y de plátano teniendo en cuenta que los resultados que se alcanzan en los sistemas de inmersión temporal dependen de la variedad y considerando la prioridad que ha dado el país a la producción de alimentos.