

Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var. IBP 89-112

Manuel de Feria Silva*, Elio Jiménez González y Maité Chávez Milián. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Teléfonos: 53 (42) 281257, 281268. Fax: 53 (42) 281329. e-mail: mdeferia@uclv.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de aumentar la eficiencia en la multiplicación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. var. IBP 89-112), se emplearon sistemas de inmersión temporal con una capacidad de 3.7 litros y se estudiaron el efecto de la densidad de inoculación y el número de veces que se renovó el medio de cultivo. Los resultados obtenidos permitieron definir que con 40 brotes por frasco de cultivo como densidad inicial, fueron alcanzados los mayores valores en cuanto al número de brotes por frasco (437) y el peso promedio por brote (0.574 g), con un incremento promedio diario del peso fresco por frasco de 8.72 g y un coeficiente de multiplicación de 10.92, el cual presentó diferencias estadísticas con respecto al tratamiento control en medio de cultivo semisólido (4.48). La renovación del medio de cultivo en más de una ocasión tuvo un marcado efecto en el coeficiente de multiplicación y en el peso de los brotes. Los mejores resultados se obtuvieron al renovar el medio de cultivo a los 14 días, pues se alcanzó el mayor número de brotes por frasco (520) con un coeficiente de multiplicación de 13.0 después de cuatro semanas de cultivo, con lo cual se hace un mejor aprovechamiento de la capacidad de cultivo instalada. Sin embargo, al aumentar el número de veces en que fue renovado el medio de cultivo, se incrementó el peso fresco promedio por brote y el peso fresco total, en detrimento del coeficiente de multiplicación.

Palabras clave: caña de azúcar, coeficiente de multiplicación, densidad de inoculación, medio de cultivo

ABSTRACT

With the objective to increase the efficiency in the *in vitro* multiplication of the sugarcane (*Saccharum* spp. var. IBP 89-112), temporary immersion systems with a capacity of 3.7 liters were used and the effect of the inoculation density and the number of times that was renewed the culture medium were studied. The obtained results allowed to define that with 40 shoots for flask of culture as initial density, the major values as for the number of shoots by flask (437) and the weight average for shoots (0.574 g) were reached, with an increase average and diary of the fresh weight for flask of 8.72 g and a multiplication rate of 10.92, which presented statistical differences with regard to the treatment control in the semisolid culture medium (4.48). The renovation of the culture medium in more than one occasion had a marked effect in the multiplication rate and in the weight of the shoots. The best results were obtained on having renewed the culture medium to the 14 days, since the major number of shoots by flask (520) with a multiplication rate of 13.0 after 4 weeks of culture was reached, with which there is done a better utilization of the capacity of culture installed. Nevertheless, to increases the number of times in which the culture medium was renewed, the fresh weight average by shoot and the fresh total weight were increased, to the detriment of the multiplication rate.

Key words: culture medium, multiplication rate, inoculation density, sugarcane

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar continúa siendo uno de los cultivos importantes para nuestro país, es por ello, que al realizar investigaciones encaminadas a aumentar la eficiencia en los procesos de propagación *in vitro* de esta especie empleando procedimientos y tecnologías avanzadas como los sistemas de inmersión temporal (SIT), se abren nuevas posibilidades y alternativas para la producción más eficiente de material de siembra para los bancos de semilla.

La propagación vía organogénesis empleada a escala comercial para la multiplicación y producción masiva de vitroplantas de caña de azúcar se ha convertido en una metodología conocida. Sin embargo, todos estos procedimientos *in vitro* conllevan una gran

utilización de mano de obra debido al elevado número de operaciones manuales y a los bajos coeficientes de multiplicación que se obtienen, lo cual trae consigo un aumento de los costos de producción (Jiménez, 1998).

El desarrollo de protocolos basados en el uso de medios de cultivo en estado líquido en algunas o todas las etapas de la micropropagación; puede reducir los costos y la manipulación en la propagación *in vitro* (Teisson y Alvard, 1994; Aitken-Christie *et al.*, 1995; Teisson *et al.*, 1996).

Los SIT constituyen una tecnología accesible que permite automatizar de forma parcial algunas etapas del cultivo *in vitro* con mayor facilidad para el escalado; aumentando la eficiencia biológica y

productiva del material propagado sin los efectos colaterales causados por los medios de cultivo líquido estáticos conocidos como hiperhidricidad e hipoxia (Alvard *et al.*, 1993; Escalona *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 1999; Etienne y Berthouly, 2002).

No obstante, bajo las mejores condiciones de cultivo en los SIT algunos cultivos no se multiplican adecuadamente y disminuyen su potencial en este sentido, debido entre otros factores al desarrollo excesivo de tallos y hojas que dificultan el aprovechamiento efectivo de la capacidad instalada (Pérez *et al.*, 1998).

A partir de la problemática anteriormente planteada se definieron como objetivos de este trabajo evaluar el efecto de la densidad de inóculo y de la renovación del medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación de explantes de caña de azúcar en función de aumentar la eficiencia de esta etapa del proceso de propagación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sistema de inmersión temporal

El sistema fue diseñado con frascos de cristal de 3.7 litros de capacidad, utilizando un frasco como vaso de cultivo y otro como reservorio de medio de cultivo. En la figura 1 se ejemplifica el diagrama para la conexión de este sistema como un todo. Los vasos fueron conectados entre sí mediante una manguera de silicona que se insertó en la tapa de cada recipiente y descendió hasta el fondo, de modo que permitiera el intercambio del medio de cultivo. El sistema comprendía además, una conexión a través de filtros hidrofóbicos de 0.2 μm que garantizó la esterilidad del aire de entrada, mientras que la presión de aire fue controlada por un manómetro y el ritmo de inmersión lo reguló un temporizador el cual controló a su vez dos electroválvulas de tres vías, las que al abrirse indistintamente permitieron la circulación del aire y por consiguiente del medio de cultivo de un recipiente a otro.

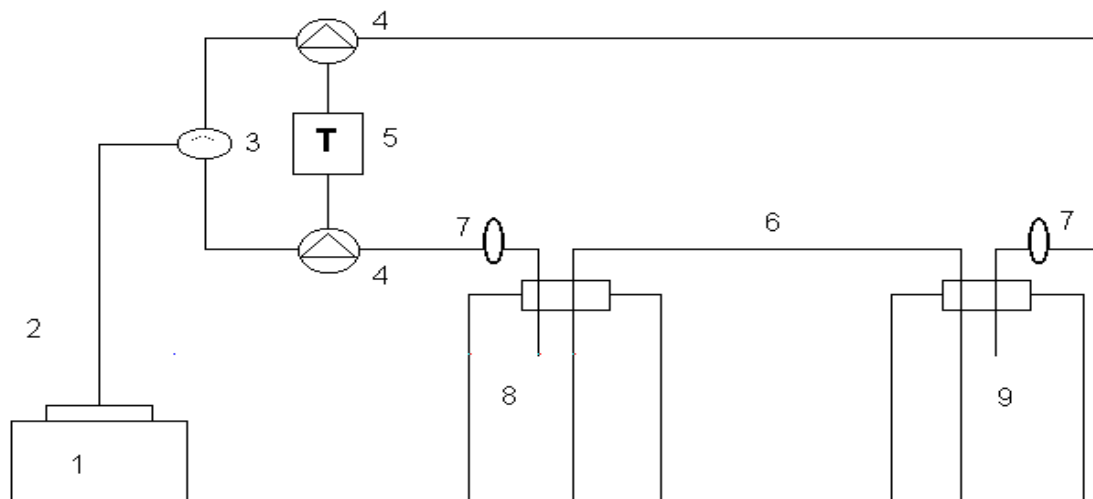


Figura 1. Diagrama de un sistema de inmersión temporal que muestra las diferentes partes componentes. 1. Compresor de aire, 2. Manguera PVC reforzada, 3. Regulador de presión, 4. Electroválvula solenoide de tres vías, 5. Temporizador, 6. Manguera de silicona, 7. Filtro (0.22 mm, Midisart 2000, Sartorius AG), 8. Frasco de cultivo, 9. Frasco reservorio de medio de cultivo.

Condiciones generales de cultivo

Cada sistema contenía tres litros de medio de cultivo de multiplicación para caña de azúcar descrito por Jiménez (1995), el cual estaba compuesto por el 100% de las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), suplementado con 1.0 mg.l^{-1} de tiamina, 0.2 mg.l^{-1} de 6-BAP, 30 g.l^{-1} de sacarosa y 5.6 de pH, la esterilización se realizó en autoclave a 121°C y 1.1 Kg.cm^{-2} de presión durante un tiempo de 20 minutos.

Como material vegetal para iniciar los experimentos se emplearon brotes con más de 1.0 cm de altura de la variedad IBP 89-112 que se encontraban en un segundo subcultivo de multiplicación.

Se realizaron cuatro inmersiones por día, los sistemas se colocaron en cámaras de cultivo con una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos que osciló entre 100-125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y una temperatura de cultivo de $28 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

Efecto de la densidad de inoculación

Con el objetivo de evaluar la respuesta de la variedad IBP 89-112 se realizó el siguiente experimento en el cual se estudió el efecto de tres densidades de inoculación (20, 30 y 40 explantes por SIT).

Los resultados fueron comparados con un tratamiento control empleando medio de cultivo

semisólido en frascos de cristal del tipo biotecnológico de 250 ml de capacidad y siguiendo la metodología descrita para la propagación de la caña de azúcar vía organogénesis descrita por Jiménez (1995).

A las cuatro semanas de cultivo se evaluó el número promedio de brotes por SIT y se calculó el coeficiente de multiplicación al dividir el número inicial de brotes colocados en cada SIT con respecto al número final obtenido a las cuatro semanas de cultivo. Se determinó además, el peso de la masa fresca total por SIT al pesar en condiciones de asepsia todo el material vegetal producido y se calcularon los valores del peso de la masa fresca promedio por brote y el incremento promedio por día del peso de dicha masa fresca.

Efecto de la renovación del medio de cultivo

Se estudiaron cinco tratamientos que comprendían:

A – Tratamiento sin renovación del medio de cultivo.

B – Tratamiento con medio de cultivo renovado a los 14 días.

C – Tratamiento con medio de cultivo renovado a los 10 y 20 días.

D – Tratamiento con medio de cultivo renovado a los 7, 14, 21 días.

E – Tratamiento control en medio de cultivo semisólido.

Se inocularon 40 brotes por cada frasco de cultivo y se evaluaron a las cuatro semanas de cultivo las mismas variables que para el experimento anterior.

Ambos experimentos fueron repetidos en tres ocasiones en el tiempo con el objetivo de garantizar la repetibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

El procesamiento estadístico se realizó mediante el paquete SPSS para Windows versión 8.0 y dentro de este un ANOVA de clasificación simple con la correspondiente prueba Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la densidad de inoculación

En todos los tratamientos con SIT se estimuló la multiplicación del material vegetal y por ende la formación de nuevos brotes, el incremento de la masa fresca total y del peso fresco por brote con respecto al tratamiento control en medio de cultivo semisólido (Tabla 1).

A medida que se aumentó la densidad de inoculación disminuyó el coeficiente de multiplicación. Sin embargo, con una densidad de 40 brotes por frasco se alcanzó la mayor producción total de brotes.

Por lo tanto, con esta densidad se logró la mejor utilización de la capacidad del frasco o lo que es lo mismo en términos de producción, un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada en las cámaras de cultivo, permitiendo manejar un mayor número de explantes por área.

Según Lorenzo *et al.* (1998) desde el punto de vista de la calidad de los brotes y el coeficiente de multiplicación, los sistemas de inmersión temporal estimulan un mejor comportamiento con respecto al sistema tradicional en medio de cultivo semisólido, estos autores incrementaron en seis veces el coeficiente de multiplicación en caña de azúcar al emplear SIT al desarrollar la fase de multiplicación.

Efecto de la renovación del medio de cultivo

El mejor tratamiento resultó ser la variante con un cambio de medio de cultivo a los 14 días (Tabla 2), pues se obtuvieron 520 brotes para un coeficiente de multiplicación de 13.0 y un peso promedio por brote de 0.491 g.

Como se puede observar (Tabla 2) siempre que se renovó el medio de cultivo se produjo un aumento del coeficiente de multiplicación y el número de brotes por frasco con respecto al tratamiento (A) en el cual el medio de cultivo nunca fue renovado y con respecto además al tratamiento control con medio de cultivo semisólido, aunque no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (C) y (D). Resultó significativo que al aumentar la frecuencia de renovación del medio de cultivo, el coeficiente de multiplicación disminuyó, incrementándose los valores de variables como el peso de la masa fresca total y el peso fresco promedio por brote.

Este comportamiento puede ser explicado entre otras, por dos razones, la primera relacionada con la mayor disponibilidad de nutrientes y la segunda por la posible eliminación de sustancias tóxicas que pueden haber sido excretadas al medio de cultivo por los explantes, cuestiones a las que se le pueden dar solución empleando sistemas de inmersión temporal (Etienne y Berthouly, 2002).

Esto indica que unido a parámetros clásicos abordados en este sistema de propagación como la frecuencia y la duración de las inmersiones (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1994 y Teisson, 1997), es necesario investigar otros factores como la densidad de inóculo por frasco y los aspectos nutricionales que permiten una utilización más eficiente del método.

Tabla 1. Efecto de la densidad de inoculación en la multiplicación de brotes de caña de azúcar (*Sacharum* spp. var. IBP 89-112) después de cuatro semanas de cultivo empleando sistemas de inmersión temporal.

Tratamientos (Explantos iniciales por SIT).	No. promedio de brotes obtenidos por SIT.	Coefficiente de Multiplicación	Peso de la masa fresca total Por SIT (g)	Peso fresco promedio por brote (g)	Incremento diario de la masa fresca (g)
20	257 c	12.85 a	136.2 c	0.530 b	4.86 c
30	327 b	10.90 b	174.6 b	0.534 b	6.28 b
40	437 a	10.92 b	251.0 a	0.574 a	8.72 a
Control (MS)	--	4.48 c	--	0.268 c	--
X ± ES	340.33 ± 3.38	9.78 ± 0.21	187.26 ± 1.85	0.476 ± 0.008	6.62 ± 0.14

Letras distintas dentro de una misma variable evaluada difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan

Tabla 2. Efecto de la renovación del medio de cultivo en la multiplicación de brotes de caña de azúcar (*Sacharum* spp. var. IBP 89-112) empleando sistemas de inmersión temporal.

Tratamiento s	No. De brotes por SIT	Coefficiente de Multiplicación	Peso de la masa fresca total por SIT (g)	Peso fresco promedio por brote (g)	Incremento diario de la masa Fresca (g)
A	419 c	10.47 c	235.0 d	0.560 b	7.98 c
B	520 a	13.00 a	255.6 c	0.491 c	8.89 b
C	468 b	11.70 b	275.1 b	0.587 ab	9.60 ab
D	450 b	11.25 b	295.0 a	0.655 a	10.19 a
E	----	3.90 d	----	0.365 d	----
X ± ES	464.25 ± 4.62	10.06 ± 0.22	265.17 ± 2.63	0.531 ± 0.01	9.16 ± 0.2

Letras distintas dentro de una misma variable evaluada difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan

- A – Tratamiento sin renovación del medio de cultivo.
 B – Tratamiento con medio de cultivo renovado a los 14 días de cultivo.
 C – Tratamiento con medio de cultivo renovado a los 10 y 20 días de cultivo.
 D – Tratamiento con medio de cultivo renovado a los 7, 14, 21 días de cultivo.
 E – Tratamiento control en medio de cultivo semisólido.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron varios resultados preliminares durante la multiplicación de brotes de caña de azúcar en particular de la variedad IBP 89-112 empleando sistemas de inmersión temporal, en relación con la densidad de inóculo se observó como a medida que esta aumentó disminuyó el coeficiente de multiplicación. Sin embargo, fue en el tratamiento con mayor densidad de inoculación, donde se obtuvo la mayor producción de brotes por frasco, esto son dos aspectos importantes a tener en cuenta, pues las estrategias a seguir pudieran estar condicionadas a trabajar en algunos casos con una variante que permita obtener un mejor coeficiente de multiplicación o en otros casos a obtener el mayor número de brotes por frasco. No obstante, es un resultado que deberá seguir siendo objeto de estudio y evaluar varios tratamientos con densidades superiores.

Se demostró además, que la renovación del medio de cultivo en estos sistemas puede ser otra de las variantes a tener en cuenta en el manejo y la estrategia a seguir en determinadas etapas del proceso de multiplicación en caña de azúcar, debido a que en algunos casos con determinada frecuencia se logró aumentar el coeficiente y en otros se logró incrementar el desarrollo de los brotes.

REFERENCIAS

- Aitken Christie, J, Kozai T y Takayama S (1995) Automation in plant tissue culture – general introduction and overview. En: Aitken Christie, J, Kozai T y Smith MA (Eds). Automation and environment control in plant tissue culture, pp. 1-18
- Alvard, D, Cote F y Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 55-60
- Escalona, M, Lorenzo J, González J, Daquinta M, Borroto C y Espinoza P (1998) Algunos factores que afectan la proliferación de plantas en sistemas de inmersión temporal. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología vegetal. REBIO'98. 1-5 Junio, La Habana, Cuba. Libro de resúmenes. p. 42
- Etienne, H y Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215-231
- Jiménez, E (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas. Cuba
- Jiménez, E (1998) Generalidades del cultivo *in vitro*. En: J. N. Pérez, Y. Alvarado, R. Gómez, E. Jiménez, P. Orellana (Eds.), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 13-24 Santa Clara
- Jiménez, E, Pérez N, de Feria M, Barbón R, Capote A, Chavéz M, Quiala E y Pérez JC (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 19-23
- Lorenzo, J, González B, Escalona M, Teisson C, Espinoza P y Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 197-200
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497
- Pérez, J, Jiménez E y Agramonte D (1998) Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: J. N. Pérez, Y. Alvarado, R. Gómez, E. Jiménez, P. Orellana (Eds.), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 179-191 Santa Clara
- Teisson C y Alvard D (1994) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. En: Proceedings of the 8th international congress on plant tissue and cell culture, Florence, Italy, 12-17 June. p. 105-110
- Teisson, C (1997) RITA an apparatus for application of temporary immersion in plant tissue culture. BIOVEG 97. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas BIOVEG 97. Libro de resúmenes
- Teisson, C, Alvard D, Berthouly B, Cote F, Escalant J, Etienne H y Lartaud M (1996) Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. Acta Horticulturae. 440: 521-526
- Ventura, J, Menero V, López J, García M, Rodríguez S, García J y Reynaldo D (1998) Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de banano FHIA-18. III Encuentro latinoamericano de biotecnología vegetal. Palacios de convenciones de la Habana. FAO. Cuba. p 64