

Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal para la producción de vitroplantas de caña de azúcar

Aydiloide Bernal Villegas^{1*}, Zenaida Occeguera Aguila¹, Mayra Jiménez Vázquez¹, Odalys Rivera Fernández¹, Leyanis García Aguila², Manuel de Feria Silva². *Autor para correspondencia.

¹ Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara Cienfuegos. Autopista Nacional km. 246. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba. e- Mail: epica@civc.inf.cu.

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuani km. 5^{1/2}. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en la Biofábrica de la caña de azúcar perteneciente a la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) Villa Clara - Cienfuegos. Tuvo como objetivos estudiar el efecto de la inmersión temporal en el coeficiente de multiplicación de diferentes genotipos de caña de azúcar, evaluar la influencia del número de subcultivos y el tipo de frascos en el coeficiente de multiplicación y establecer las normas de producción para la fase de multiplicación empleando sistemas de inmersión temporal. Los resultados obtenidos evidenciaron que independientemente del genotipo evaluado, el coeficiente de multiplicación se incrementó, observándose en la variedad con menor respuesta valores desde 1.0 en 3.9 en el sistema convencional hasta 1.0 en 31.7 con inmersión temporal. Con respecto al volumen del frasco de cultivo se observó que este tuvo un efecto marcado sobre el coeficiente de multiplicación. Los mejores resultados se alcanzaron al emplear frascos de 10 litros de capacidad, con coeficientes que oscilaron entre 89.3 hasta 100 unidades, lo cual demostró la factibilidad del empleo de los sistemas de inmersión temporal como parte de una estrategia de semiautomatización del proceso de micropropagación de la caña de azúcar y además permitió determinar que un operario debe procesar 3290 explantes en una jornada laboral. Al mismo tiempo, se pudo determinar que el tiempo de trabajo se redujo al emplear los sistemas de inmersión temporal y por consiguiente aumentó la productividad del proceso.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, explantes, micropropagación, semiautomatización

ABSTRACT

This work was done at the sugarcane biofactory belonging to the *Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA)* Villa Clara – Cienfuegos. The objectives were to study the effect of temporary immersion on the multiplication coefficient of different sugarcane genotypes, evaluate the influence of the number of subcultures and the type of vessel on the multiplication coefficient and establish the production norms for the multiplication phase using temporary immersion systems. The results obtained showed that independently of the genotype evaluated, the multiplication coefficient increased with observation in the varieties with lowest values from 1.0 in 3.9 in the conventional system and up to 1.0 in 31.7 with temporary immersion. With respect to the volume of the vessel, there was a marked effect on the multiplication coefficient. The best results were obtained using vessels of 10 L capacity with coefficients that oscillated between 89.3 up to 100 units, which demonstrated the feasibility of using the temporary immersion systems as part of a strategy to semi-automate the micropropagation process of sugarcane and besides it allowed us to determine that one operator should process 3290 explants in a work-day. At the same time, it was possible to determine that the work time reduces on using temporary immersion systems and hence increased the productivity of the process.

Key words: explants, micropropagation, multiplication coefficient, semi-automation

INTRODUCCION

Desde el año 1980 se ha trabajado en Cuba la Biotecnología Vegetal en caña de azúcar, vinculando el uso de la propagación a escala comercial con la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos. Esta técnica ha permitido la producción de semilla de alta calidad para su posterior reproducción en Bancos de Semilla Básica y Registrada con destino a los CAI y UBPC cañeras.

Existe una gran demanda de material de plantación de caña de azúcar, lo cual no se ha satisfecho por

los métodos convencionales de micropropagación. Jiménez (1995) desarrolló un protocolo para su micropropagación, aunque sus posibilidades están limitadas como resultado de su bajo coeficiente de multiplicación y el costo de producción relativamente elevado. Estas razones hacen necesario el desarrollo de sistemas de producción más eficientes (Lorenzo *et al.*, 1999).

La combinación de métodos de propagación convencional con modernas técnicas de micropropagación constituyen una de las estrategias que se emplean en Cuba. En ambos casos, se trabaja

para su perfeccionamiento, por lo cual el presente trabajo tuvo como principal objetivo: Estudiar el efecto de la inmersión temporal en el coeficiente de multiplicación de diferentes genotipos de caña de azúcar, evaluar la influencia del número de subcultivos y el tipo de frasco en el coeficiente de multiplicación y establecer las normas de producción para la fase de multiplicación empleando sistemas de inmersión temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en la Biofábrica de caña de azúcar asociada a la Estación Territorial de Investigación de la Caña de Azúcar (ETICA) Villa Clara - Cienfuegos. Como material vegetal se utilizaron explantes de caña de azúcar en el tercer subcultivo (*Saccharum* spp. híbrido), de tres variedades: C86-12, C1051-73 y SP70-1284. Los procedimientos para el establecimiento y el cultivo *in vitro* se desarrollaron según la metodología propuesta por Jiménez (1995).

El medio de cultivo utilizado para multiplicación en la micropropagación convencional fue el compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962), MS al 100% suplementado con 0.02 mg.l^{-1} de 6 Bencil aminopurina y 3.0% de sacarosa y se ajustó el pH a 5.8 previo a la esterilización.

El medio de cultivo utilizado para la multiplicación en los SIT estuvo compuesto por sales MS enriquecidas con 0.6 mg.l^{-1} de 6-BAP, 0.5 mg.l^{-1} de Paclotrazol, 100 mg.l^{-1} de mioinositol, 3.0% de sacarosa y se ajustó el pH a 5.8 previo a la esterilización (Marrero *et al.*, 1998).

El medio de cultivo empleado para la elongación de los explantes en los SIT, estuvo compuesto por las sales MS enriquecidas con 100 mg.l^{-1} de mioinositol, 0.05 mg.l^{-1} de ácido giberélico, 1.0 mg.l^{-1} vitamina y 3.0% de sacarosa y se ajustó el pH a 5.8 previo a la esterilización (Marrero *et al.*, 1998).

La densidad de inóculo colocada por frasco de un litro fue de 10 clusters y 30 clusters para frascos de 10 litros (Marrero *et al.*, 1998). Este proceso se realizó en una cabina de flujo laminar y flameando la boca del frasco con un mechero de gas antes y después de destaparlos.

Condiciones de cultivo para la Inmersión temporal en caña de azúcar

El desarrollo de los explantes en los SIT se produjo bajo luz artificial con densidad de flujo fotosintético: $42.0 - 48.0 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-2}$, un fotoperíodo: 16 h luz y 8 h de oscuridad. La temperatura de incubación: $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. El número de inmersiones por día fue de 8.0 con una duración de 3.0 minutos, según lo establecido por Marrero *et al.* (1998).

Al material vegetal utilizado se le realizaron cinco subcultivos en los SIT por ciclo, siendo el tiempo de subcultivo de 45 días. En los primeros 30 días los explantes fueron colocados en medio de cultivo de multiplicación, posteriormente se pasaron a medio de cultivo de elongación por un tiempo de 15 días.

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los resultados de los experimentos realizados se empleó el análisis de varianza de clasificación simple y comparación múltiple de medias a través del Test de Duncan. Se utilizó el paquete estadístico de SPSS/PC versión 9 para Windows.

Efecto de la inmersión temporal en el coeficiente de multiplicación

Con la finalidad de evaluar el coeficiente de multiplicación en los sistemas de inmersión temporal en las tres variedades de caña de azúcar, se realizó esta investigación que partió del tercer subcultivo del método de propagación convencional. Se estudiaron cinco subcultivos en SIT con una duración de 45 días, partiendo de una densidad de inóculo de 10 clusters/frasco de 1.0 litro de volumen, los cuales contenían 500 ml de medio de cultivo.

Las evaluaciones se realizaron al final de cada subcultivo y para calcular el coeficiente de multiplicación se tuvo en cuenta el número de explantes al final del subcultivo entre la densidad de inóculo.

Influencia del tipo de frasco en la multiplicación de los explantes

Con el objetivo de conocer como influía el volumen del frasco en el coeficiente de multiplicación de las tres variedades en estudio, se evaluaron SIT con frascos 1.0 y 10 litros de capacidad, inoculados según corresponde a cada uno. Las evaluaciones se realizaron a los 45 días, en el tercer subcultivo teniendo en cuenta que en este se habían obtenido los coeficientes de multiplicación más elevados para ambos sistemas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Influencia de los métodos de propagación en el coeficiente de multiplicación de las tres variedades en estudio

Al comparar el empleo de los sistemas de inmersión temporal con respecto al proceso de micropropagación se observó que los coeficientes de multiplicación obtenidos independientemente del genotipo evaluado, fueron estadísticamente superiores en los sistemas de inmersión temporal (Tabla 1) con respecto a los resultados al aplicar el sistema convencional.

Tabla 1. Comportamiento del coeficiente de multiplicación en diferentes sistemas de micropropagación evaluados para tres variedades de caña de azúcar a los 45 y 21 días de cultivo respectivamente.

Variedad	SIT	Sistema Convencional	
	Coeficiente de multiplicación	Coeficiente de multiplicación	± ES
C86-12	68.2 a	4.3 b	0.43
SP70-1284	55.1 a	4.0 b	0.32
C1051-73	31.7 a	3.9 b	0.22

Valores del coeficiente de multiplicación con letras distintas para una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Al tomar como ejemplo los resultados de la variedad C1051-73 con la cual se logró el menor coeficiente de multiplicación, se observó, no obstante, que se incrementó considerablemente desde 1.0 en 3.9 con el sistema convencional y hasta 1.0 en 31.7 con los SIT, resultado este que explica cuan eficiente puede ser el proceso de multiplicación de la caña de azúcar si aplicamos para ello el uso de técnicas basadas en la inmersión temporal de los explantes. En la figura 1, se pueden observar las diferencias entre los

sistemas de propagación en cuanto al tipo de frascos, debido a la renovación de la atmósfera interna en los SIT, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por varios autores que han descrito las ventajas de los sistemas de inmersión temporal para la propagación de diferentes especies. Alvard *et al.* (1993) señalaron que los SIT les permitieron obtener los mejores resultados en cuanto al aumento del peso seco y el coeficiente de multiplicación trabajando con el cultivar Gran Enano.



Figura 1. Sistema de inmersión temporal empleado para la micropropagación de diferentes genotipos de caña de azúcar.

Pérez *et al.* (1998), compararon el proceso de multiplicación en caña de azúcar empleando el sistema tradicional y los SIT y obtuvieron los mejores resultados en cuanto al número de brotes por unidad de SIT (437 vitroplantas) con una producción de biomasa total de 251g. Mientras que, en la variedad C1051-73, Lorenzo *et al.* (1999) duplicaron el coeficiente de multiplicación y la altura de los brotes en los SIT, en comparación con la micropropagación convencional, permitiendo reducir los costos en un 46% y la calidad de las plantas obtenidas, las cuales tienen un mejor comportamiento en condiciones *ex vitro*.

Los resultados obtenidos demostraron al comparar el coeficiente de multiplicación alcanzado en los SIT con los valores logrados en la micropropagación convencional, que es posible aumentar las capacidades productivas de la instalación, mediante la semiautomatización del proceso productivo, lo cual redundaría en un aumento de la productividad de la Biofábrica y un decrecimiento de los costos de producción.

Efecto del número de subcultivos en el coeficiente de multiplicación

A partir de estos resultados, se puede observar en la figura 2, que el coeficiente de multiplicación independientemente del genotipo, se incrementó hasta el tercer subcultivo lo cual pudo estar relacionado con la influencia positiva que sobre este proceso ejercen factores como el contacto intermitente de los explantes con el medio de cultivo y la renovación de la atmósfera del vaso de cultivo.

A pesar de las amplias ventajas de los medios de cultivo líquidos, tienen la limitante de que no todas las especies y/o genotipos responden de igual manera y se ha observado una tendencia a la reducción del coeficiente de multiplicación a medida que se dan subcultivos continuos en medio líquido estático (Orellana *et al.*, 1991). Por su parte, Ortega *et al.* (1992), en el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) observaron que a medida que aumentaba la edad *in vitro* disminuía el coeficiente de multiplicación, reduciéndose desde 5.3

en el primer subcultivo de multiplicación hasta 2.2 en el sexto subcultivo. Según estos autores, es posible que esta disminución se deba en parte al efecto del subcultivo continuado en medio de cultivo líquido.

No obstante, al cuantificar la cantidad de explantes obtenidos después de cinco subcultivos, los resultados permitieron comprobar que se había

alcanzado en ese momento una multiplicación de los explantes de 1.0 en 10 000, y por consiguiente el límite máximo preestablecido para la multiplicación de la caña de azúcar según el protocolo establecido para la micropropagación de esta especie, límite este que tiene como objetivo reducir la posible aparición de materiales con variabilidad genética, debido entre otros factores a que esta especie presenta un alto grado de poliploidía.

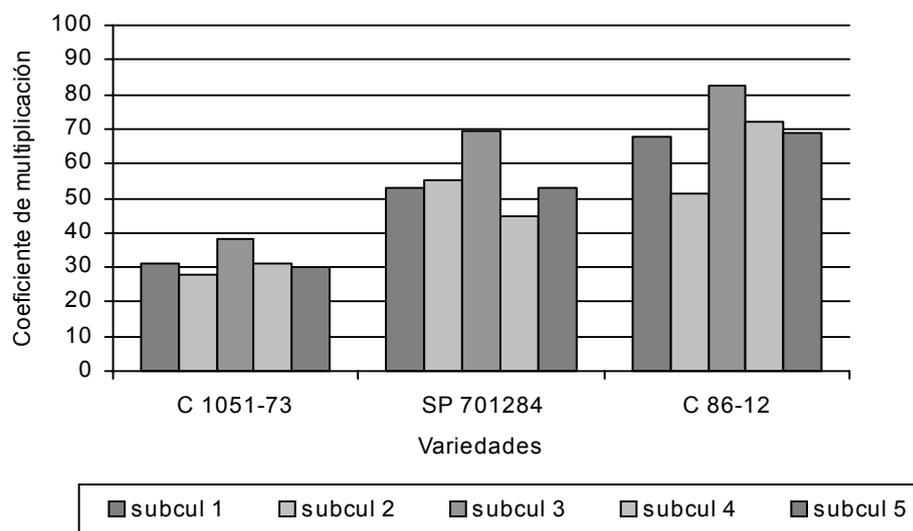


Figura 2. Comportamiento del coeficiente de multiplicación de las tres variedades estudiadas durante cinco subcultivos empleando sistemas de inmersión temporal. Sin embargo, después del tercer subcultivo en inmersión temporal reflejan una disminución del coeficiente de multiplicación independientemente del genotipo evaluado.

Influencia del tipo de frasco en la multiplicación de los explantes

Estos resultados demostraron que con independencia del genotipo existió una influencia positiva del volumen

del frasco de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación. En las tres variedades se observó que el coeficiente de multiplicación fue superior cuando se emplearon frascos con un volumen de 10 litros (Tabla 2).

Tabla 2. Influencia sobre el coeficiente de multiplicación de explantes de caña de azúcar al emplear para la inmersión temporal, frascos de cultivo de diferentes volúmenes.

Varieties	SIT de 1.0 litro de volumen	SIT de 10.0 litros de volumen	± ES
C 86-12	68.2 b	92.1 a	0.52
SP 701284	55.1 b	100.0 a	0.81
C 1051-73	31.7 b	89.3 a	0.72

Valores del coeficiente de multiplicación con letras distintas para una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Resultados similares, aunque empleando medio de cultivo líquido estático, obtuvo Ramírez (2000) cuando estudió en caña de azúcar el comportamiento del coeficiente de multiplicación en tres tipos frasco con diferentes volúmenes. Según Ziv (1995), cuando los brotes crecen en frascos pequeños, estos están expuestos a un limitado potencial hídrico y osmótico en el medio de cultivo y un limitado intercambio de CO_2 y O_2 . Por su parte, los sistemas con frascos de mayor volumen proveen a los explantes de mejores condiciones de cultivo para su crecimiento, pues el contacto con el medio de cultivo a una determinada

frecuencia y corta duración permite una mayor renovación de la atmósfera interna del frasco, lo que mejora la oxigenación de los tejidos, además de permitir la producción de un mayor volumen de material en un menor espacio y un período de tiempo más corto.

Establecimiento de la norma de producción en los SIT

Para la inoculación de un SIT de un litro el tiempo que se necesita (según valores medios) es de 20.0

minutos y se alcanza una productividad por hora de 2.94 SIT; mientras que para inocular los frascos de 10 litros el tiempo es de 35.6 minutos y la productividad por hora es de 1.69 SIT, esto se debe fundamentalmente a que la densidad de inóculo es mayor y se dificulta aun más la manipulación de los frascos debido al tamaño.

A pesar de obtener la menor productividad al inocular los sistemas de 10 litros, se obtiene en ellos la mayor eficiencia productiva, debido a que se alcanzan los mayores coeficientes de multiplicación. A la hora de extraer los explantes de los sistemas, la productividad en los SIT de un litro es mayor que cuando se trabaja con frascos de 10 litros, pero en estos últimos se obtiene una mayor cantidad de explantes.

A través de los valores medios, se pudo determinar que un operario procesa 1 386 explantes producidos por SIT de un litro en 84.5 minutos, logrando una productividad por hora de 986.2 explantes, por lo que en una jornada laboral un operario debe procesar 3 290 explantes. Se aprecia que el tiempo

que necesita un operario para en la operación de extracción de los explantes de los frascos de 10 litros es de casi toda la jornada laboral (seis horas). Esta productividad es menor si está relacionada con la productividad con los SIT de un litro, la cual está dada por el reducido diámetro de la boca del frasco lo que dificulta la manipulación, la gran masa de material vegetal que se obtiene y la cantidad de extracciones que se realizan durante la manipulación de los frascos. Teniendo en cuenta estos resultados es posible aseverar que la dificultad principal con los SIT de 10 litros de capacidad está en el proceso de extracción, ya que estos tienen como ventaja la reducción de espacio en las cámaras de cultivo y en los estantes, así como un mayor coeficiente de multiplicación que contribuye al aumento de la eficiencia del sistema de micropropagación.

Utilizando los valores medios calculados anteriormente se lograron establecer las siguientes dos estrategias para producir 1 000 000 de vitroplantas de caña de azúcar empleando inmersión temporal con una capacidad de 1.0 y 10 litros (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las estrategias productivas utilizando sistemas de inmersión temporal de 1.0 y 10 litros para la producción de vitroplantas de caña de azúcar.

	Días		No. de SIT		No. De Explantes		Tiempo de labor (h)		No. de frascos	
	SIT 1.0	SIT 10	SIT 1.0	SIT 10	SIT 1.0	SIT 10	SIT 1.0	SIT 10	SIT 1.0	SIT 10
Labor	1.0		1.0				1.0		1.0	
Inoculación	0	0	3	3*	30	30	1	1	6	6
Cambio de Medio	30	30	3	3*	30	30	1	1	6	6
Cosecha	45	45	96	30	960	900	33	18	192	60
Cambio de Medio	75	75	96	30	960	900	6	2	192	60
Cosecha/ 1 ^{er} sub. Mult.	90	90	0	-	30000	72 000	62	203	-	-
2 ^{do} sub. Mult	110	110	0	-	90000	72 000	210	492	-	-
Sub. Enr./PT	130	130	0	-	250000		570	50	-	-
Prod.Term.	150	-	-	-			60	-	-	-
Valores Máximos			99	30+3*	250000	72 000	943	760	294	90+9*

* Sistemas de Inmersión Temporal de 1.0 litro de capacidad.

Cuando se emplearon frascos de 1.0 litro de volumen se debió iniciar un ciclo cada 70 días y este se hizo cuatro veces al año para producir 1 000 000 de vitroplantas de caña de azúcar y el tiempo total empleado fue de 157 días. Al usar frascos de mayor volumen (10 l), se debe iniciar un ciclo cada 60 días, con una frecuencia de cinco ciclos en el año para producir igual cantidad de vitroplantas de caña de azúcar y el tiempo total empleado es de 160 días.

Estos resultados demuestran que una de las ventajas de los SIT como sistemas semiautomatizados empleados en función de la producción de vitroplantas, es la reducción del tiempo de trabajo en comparación con el método convencional, lo que permite incorporar a este mismo personal a otras labores de producción y realizar multifuncion. Independientemente del genotipo empleado, los resultados obtenidos en el presente estudio

demuestran las ventajas de los SIT para la multiplicación de la caña de azúcar por esta vía y como pueden ser incluidos estos sistemas en una estrategia a escala productiva, a partir de la definición de los tiempos empleados para desarrollar cada etapa del proceso.

REFERENCIAS

- Alvard, D, Cote F y Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 55 -60
- Jiménez, E (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV, Fac. Ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. pp. 93
- Jiménez, E, Pérez J, Gil V, Herrera J, García Y y Alfonso E (1995) Sistemas para la propagación de caña de azúcar. En: Estrada M, Riego E, Limonta E, Tellez P, Fuentes J (Eds). *Avances de la Biotecnología Moderna. Elfos Scientiae*. Cuba 3:11.2
- Lorenzo, JC, González B L, Escalona M, Teisson C, Castillo R, Espinosa P, Sánchez M, Espinosa D, Puentes C, Fundora Z, Iglesias A, Borroto C, Aspiolea ME, Hernández Z y Capote I (1999) Proliferación de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Cuaderno de Fitopatología* 26: 76-79
- Marrero, D, Montes de Oca JL, Ravelo D, De León E, Jiménez M, Quintero N, López A, Lorenzo JC, González BL, Escalona M, Espinosa D, Puentes C, Fundora Z, Iglesias A, Borroto C, Aspiolea ME y Cid M (1998) Sistema de Inmersión Temporal en caña de azúcar. Cambios de Tecnología en Biofábrica. Resumen XIII Jornada Científica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Cuba
- Murashige, T. y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Orellana, P, Pérez J, Agramonte D, Gómez R y Jiménez E (1991) La micropropagación de plátanos y bananos a escala comercial en Cuba. *ACEVIV. Boletín Científico* 3(3): 29-38
- Ortega, RP, Pérez J, Gil V y Gómez R (1992) Metodología para la propagación *in vitro* de *Carica papaya* L. Tesis para optar por el Grado de Maestro en Ciencias, Especialidad de Biotecnología Vegetal, IBP, Santa Clara. Villa Clara. Cuba
- Pérez, J, Jiménez E y Agramonte D (1998) Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez Ponce, JN (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* pp. 179-190. Santa Clara, Cuba
- Ramírez, D. 2000. Introducción de nuevos frascos en el proceso productivo en las Biofábricas. Tesis presentada en opción al Grado Académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba
- Ziv, M (1995) *In vitro* acclimatization. En: Aitken-Christie, J; T. Kosai; A L Smith (Eds). *Automation and environmental control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, pp. 301 – 319 Dordrecht