

## Influencia de la formulación salina en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar a dos temperaturas

Leyanis García Águila\*, Juan N. Pérez Ponce, Mayelin Rodríguez Urquiza, Blanca Pérez, Yudit Martínez Pérez, Zoe Sarría Hernández. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5,5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba CP 54830.e-mail. legarcia@ibp.uclv.edu.cu, leyanis02@yahoo.es

### RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia de la formulación salina para la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar de la variante somaclonal IBP 87-100. Se estudiaron diferentes concentraciones de las formulaciones salinas MS (25, 50, 75, 100%) y White (75, 100, 125%) asociadas a dos temperaturas de cultivo, 18 y 26  $\pm$ 2 °C. Se determinó el porcentaje de supervivencia y el estado fisiológico de las plantas durante el período de conservación. Al concluir se obtuvo como resultado la conservación de las plantas durante seis meses consecutivos cuando se utilizó la formulación MS reducida al 25 y 50%, asociada a una temperatura de cultivo de 18°C. De esta manera el crecimiento de las plantas fue lento y fueron menores los daños fisiológicos, con valores de supervivencia entre el 58.3 y 69.2%. Sin embargo la formulación White no favoreció la prolongación del período de conservación y las plantas solo pudieron mantenerse durante dos meses con más del 50% del área foliar seca. Este comportamiento pudo estar dado por los bajos niveles de nitrógeno que contiene esta formulación.

Palabras clave: concentración salina, conservación *in vitro*, supervivencia, temperatura de cultivo

### ABSTRACT

The present work had as aim to determine the saline formulation and its ideal concentration, as well as the culture temperature for the conservation of *in vitro* plants of sugar cane from the variety somaclonal IBP 87-100. Different concentrations of the saline formulations were studied MS (25, 50, 75, 100%) and White (75, 100, 125%) associated with two culture temperatures, 18 and 26  $\pm$ 2°C. The percentage of survival and the physiological condition of the plants during the period of conservation were decided. The conservation of the plants during six consecutive months was obtained as result when using the formulation MS reduced to 25 and 50%, associated with a culture temperature at 18°C. This way the growth of the plants was slow and minor the physiological hurts, with values of survival between 58.3 and 69.2%. Whereas the formulation White did not favour the prolongation of conservation period and the plants only could be supported during two months with more than 50% of the foliate area dried. This behaviour could response due to the low levels of nitrogen that contains this formulation.

Key words: culture temperature, *in vitro* conservation, saline concentration, survival

### INTRODUCCIÓN

La conservación del germoplasma de la caña de azúcar se ha efectuado tradicionalmente a través de colecciones de campo; pero a pesar de los esfuerzos por mantenerlas, las mismas están expuestas al ataque de plagas, a la erosión genética y a las condiciones ambientales adversas. Además, el mantenimiento de extensas áreas cultivables implica altos costos (Pérez *et al.*, 1997).

El desarrollo del cultivo *in vitro* ha permitido el establecimiento de nuevos métodos de propagación en especies de reproducción vegetativa y con ello nuevas alternativas para la conservación *ex situ* del germoplasma de la caña de azúcar. El método de conservación *in vitro* más generalizado es el denominado "crecimiento mínimo". Se basa en modificaciones de las condiciones óptimas de cultivo que disminuyan el crecimiento, con el cual se reduce

la frecuencia de transferencia de las plantas a medios de cultivo fresco.

La modificación en la composición del medio de cultivo es una de las formas de reducir el crecimiento. Esto se logra con el uso de medios de cultivos menos enriquecidos que los utilizados en la propagación, privándolos de ciertos nutrientes inorgánicos y orgánicos. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia de formulación salina para la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar a dos temperaturas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Técnicas y procedimientos generales

Los experimentos se iniciaron con la selección en campo de plantas de la variante somaclonal IBP 87-100 de las cuales, se tomó la zona apical de las

plantas que contenía el meristemo apical y varias hojas jóvenes. La desinfección superficial del material vegetal se realizó con la inmersión en etanol al 70% durante 2 minutos y posteriormente hipoclorito de sodio al 2.0% por 15 minutos. La disección de los tejidos y las transferencias a medio de cultivo fresco se desarrollaron bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar.

Los medios de cultivo utilizados durante las fases de establecimiento de los ápices y multiplicación de las plantas fueron los propuestos por Jiménez (1995). Las plantas *in vitro* obtenidas fueron sometidas a la detección de contaminantes bacterianos a través de la utilización de medio de cultivo bacteriológico Agar de Wilbrink (Alvarado *et al.*, 2001). Las plantas negativas, en fase de

multiplicación, constituyeron el material vegetal de partida para el estudio de conservación. Para ello se seleccionaron plantas de 1.5 a 2.0 cm de altura (Figura 1).

Los estudios de conservación se realizaron en tubos de ensayo (14.5cm x 2.0cm) a los que se le adicionaron 15 ml de medio de cultivo semisólido con 5g.l<sup>-1</sup> de agar (Agar tipo extra fuerte BIOCEN) y en cada uno se colocó una planta. Las diferentes variantes estudiadas contenían 30g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y carecían de reguladores del crecimiento.

Durante el desarrollo de la investigación se estudiaron las formulaciones salinas propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962) y White (1963) para la conservación *in vitro* de plantas de caña (Tabla 1).

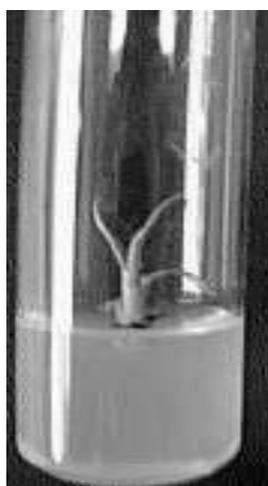


Figura 1: Planta *in vitro* de caña de azúcar (IBP 87-100) de 1.5 a 2.0 cm de altura.

Tabla 1. Composición mineral de las formulaciones MS y White.

Formulación de Sales MS		Formulación de Sales White	
Componentes	mg.l <sup>-1</sup>	Componentes	mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	332.02	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	300.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.47
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.001
FeNa EDTA	36.70	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	KCL	65.00
KI	0.83	KI	0.75
KNO <sub>3</sub>	1900.00	KNO <sub>3</sub>	80.00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.00	MgSO <sub>4</sub>	351.60
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5.31
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	MoO <sub>3</sub>	0.0001
Na <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.35
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.67
Total	4491.55	Total	1025.65

### **Efecto de diferentes concentraciones de la formulación MS en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar**

Las concentraciones estudiadas fueron 25, 50, 75% con respecto al 100% o total de las sales. Las plantas se colocaron en  $26 \pm 2.0$  °C de temperatura de cultivo en cámaras de crecimiento

con luz solar y a  $18 \pm 2.0$  °C en cámaras climatizadas (Modelo Koska), bajo un fotoperíodo de 16 horas luz e intensidad luminosa de  $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 2). Durante el experimento se utilizaron como control las plantas cultivadas en el 100% de las sales MS y temperatura de cultivo de 26 °C, por ser estas las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo vegetativo en esta especie.



Figura 2: Condiciones de cultivo de plantas *in vitro* durante la conservación a 18°C (Koska).

Se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas a los dos y seis meses y el estado fisiológico se evaluó a los dos, cuatro y seis meses de conservación a través de la siguiente escala cualitativa.

I. Porcentaje de plantas con el 75% del área foliar verde.

II. Porcentaje de plantas con el 50% y menos del área foliar verde.

Se consideraron 30 plantas como réplica en cada uno de los tratamientos estudiados y el porcentaje de supervivencia y el estado fisiológico de las plantas conservadas fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de comparación de proporciones ANDEVAP, complementada con la prueba el test de Fishers o Tukey según fuera el caso.

### **Efecto de diferentes concentraciones de la formulación White en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar**

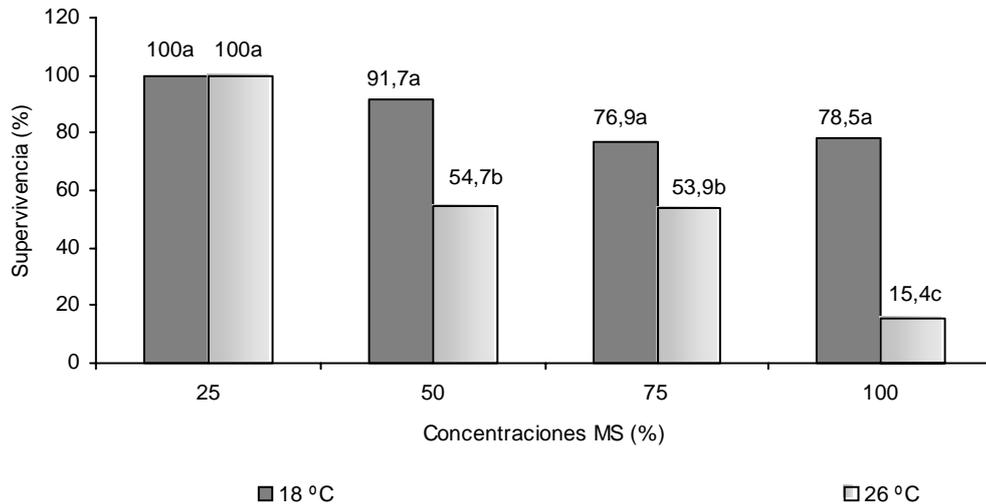
En esta formulación se estudiaron diferentes concentraciones a las estudiadas en la formulación MS por presentar menor contenido total de sales en su composición. Se estudiaron concentraciones del 75, 100 y 125% asociadas a las mismas temperaturas de cultivo del experimento anterior. Se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas y su estado fisiológico después de transcurridos los dos primeros meses de conservación. Los resultados

fueron analizados siguiendo los mismos criterios del experimento anterior.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Efecto de diferentes concentraciones de la formulación MS en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar**

Los porcentajes de supervivencia alcanzados con la utilización de las sales MS, estuvieron condicionadas a la interacción entre la concentración salina y las temperaturas de cultivo estudiadas. A los dos meses los porcentajes de supervivencia de las plantas conservadas a 26 °C de temperatura disminuyeron proporcionalmente con el incremento de la concentración salina. Estas plantas se mantuvieron en continuo crecimiento agotando rápidamente los nutrientes del medio de cultivo. Sin embargo, se observó una alta supervivencia en las plantas colocadas en la menor concentración de sales (25%) cuando se comparó con el tratamiento control. El incremento de la supervivencia de la plantas estuvo condicionado a la reducción del contenido salino del medio de cultivo cuando la temperatura fue de 26 °C. Por otra parte las plantas conservadas a 18 °C de temperatura mantuvieron porcentajes de supervivencia altos incluyendo el tratamiento control, independientemente de la concentración de sales del medio de cultivo. Aunque los máximos porcentajes de supervivencia en estas plantas se alcanzaron en los tratamientos de menor concentración salina (25 y 50%) (Figura 3).

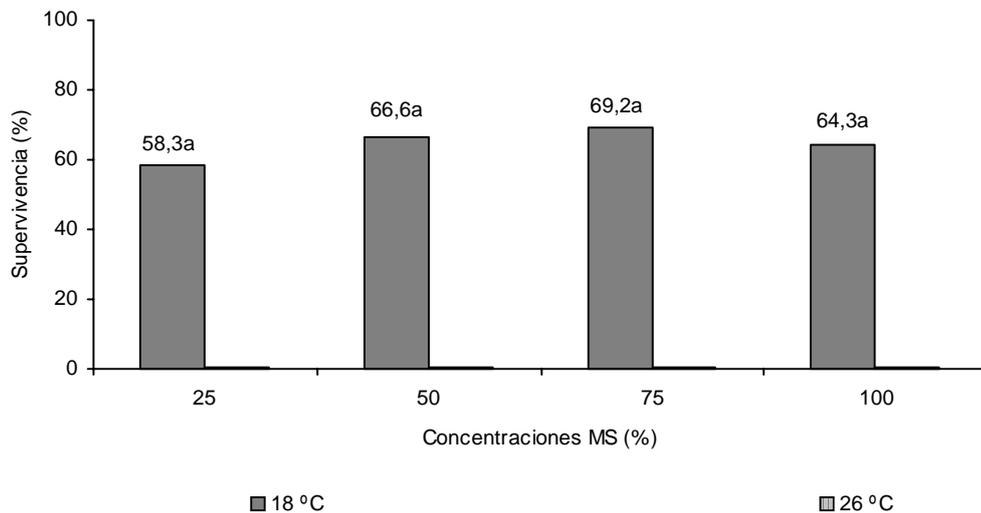


Medias con letras iguales sobre las barras no difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba el test de Fisher's.

Figura 3. Comportamiento del porcentaje de supervivencia de plantas *in vitro* de caña de azúcar (IBP 87-100) en la formulación MS a los dos meses de conservadas.

A los seis meses las plantas *in vitro* conservadas a 26°C se encontraban secas por el agotamiento de los nutrientes, así como el tratamiento control. Sin embargo, las plantas conservadas a 18°C mantuvieron porcentajes de supervivencia entre el 58.3 y 69.2% (Figura 4). Este resultado pudo estar dado por el efecto de las bajas temperaturas en la reducción de la absorción de nutrientes, que disminuye la división y el metabolismo celular. En este experimento la temperatura de 18°C propició el crecimiento lento de las plantas y se incrementó su longevidad.

Roca (1994) durante la conservación *in vitro* de papa a 24°C refirió un excesivo crecimiento de las plantas, sin embargo a temperaturas de 8 y 10°C el crecimiento fue lento y se mantuvo alta la viabilidad. Suksa *et al.* (1997) refirieron elevados porcentajes de supervivencia en ápices de papaya conservados a 16°C. Lemos *et al.* (2002) informaron un crecimiento más lento sin daños fisiológicos en explantes de caña de azúcar, cuando la temperatura de conservación se redujo de 25 a 15°C.



Medias con letras iguales sobre las barras no difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba el test de Fisher's.

Figura 4. Comportamiento del porcentaje de supervivencia de plantas *in vitro* de caña de azúcar (IBP 87-100) en la formulación MS a los seis meses conservadas.

Al analizar el estado fisiológico de plantas conservadas se observó una correspondencia con el comportamiento del porcentaje de supervivencia de las mismas. Los tratamientos donde se presentó una

menor supervivencia el grado de deterioro fisiológico de las plantas fue mayor con menos del 50% del área foliar verde. A partir de los cuatro meses las plantas conservadas a 26°C se deterioraron de

manera irreversible. La formulación White no favoreció la prolongación del período de conservación y las plantas solo pudieron conservarse durante dos meses con más del 50% del área foliar seca. Este comportamiento pudo estar dado por los bajos niveles de nitrógeno que contiene esta formulación.

Estas plantas absorbieron rápidamente los nutrientes traduciéndose en un rápido aumento de masa foliar y en consecuencia su posterior senescencia. Los menores grados de deterioro fisiológico se observaron en las plantas conservadas a 18 °C (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento del estado fisiológico (%) de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (IBP 87-100) con diferentes concentraciones de las sales MS en el medio de cultivo.

Sales (%)	Temp (°C)	Período de conservación (meses)					
		2		4		6	
		I	II	I	II	I	II
25	26	100a	-	-	100a	-	100a
25	18	100a	-	75a	25b	58.3a	41.7b
50	26	7.7bc	92.3a	-	100a	-	100a
50	18	91.7a	8.3c	66.6a	33.4b	66.6a	25b
75	26	53.8b	46.2a	-	100a	-	100a
75	18	76.9a	23.1b	76.9a	23.1b	69.2a	30.8b
100	26	15.4b	84.6a	-	100a	-	100a
100	18	78.6a	21.4b	69.2a	30.8b	64.3a	35.7b

Medias con letras iguales en una columna no difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba el test de Tukey.

I. Porcentaje de plantas con el 75 % del área foliar verde.

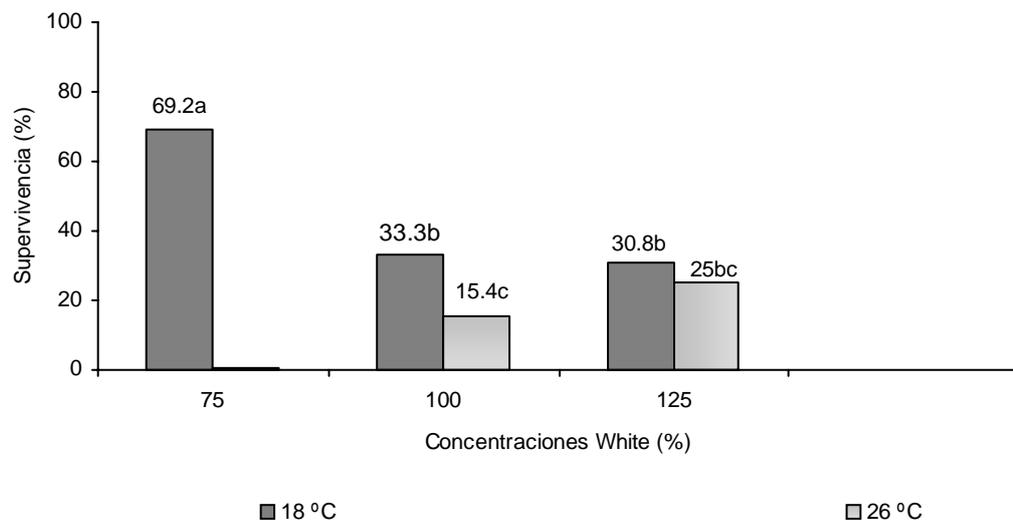
II. Porcentaje de plantas con el 50 % y menos del área foliar verde.

La formulación MS para la conservación de germoplasma *in vitro* ha sido utilizada con resultados satisfactorios en especies como papa, yuca, caña de azúcar y papaya (Roca *et al.*, 1994; Taylor, 1997; Suksa *et al.*, 1997; Toledo y Golmirzair, 1998).

#### Efecto de diferentes concentraciones de la formulación White en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar

La utilización de las sales White no favoreció la prolongación del tiempo de conservación, las plantas solo pudieron mantenerse durante dos meses. En

este periodo el valor más alto de supervivencia de las plantas (68.2%) estuvo vinculado a la menor concentración de sales (75%) y a la temperatura de cultivo de 18 °C. En los restantes tratamientos la supervivencia de las plantas osciló entre 0 y 33.3%, incluyendo el tratamiento control (Figura 5). Este comportamiento durante la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar puede estar dado por los bajos niveles de nitrógeno que contiene esta formulación (Tabla 1). Niveles de nitrógeno inferiores a 10 mM en el medio de cultivo resultaron perjudiciales en el cultivo *in vitro* de yuca (Roca, 1994).



Medias con letras iguales sobre las barras no difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba el test de Fisher's.

Figura 5. Comportamiento del porcentaje de supervivencia de plantas *in vitro* de caña de azúcar (IBP 87-100) en la formulación White a los dos meses de conservadas.

Sin embargo, Sreenivasan *et al.* (1985), señalaron la utilización de este medio de cultivo para la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar de diferentes clones de *Saccharum officinarum* L durante un período de cinco meses.

Al evaluar el estado fisiológico de las plantas conservadas en la formulación White se observó

un amarillamiento de las hojas en los diferentes tratamientos estudiados. Solamente las plantas conservadas en el 75% de concentración de las sales y temperatura de 18°C presentaron el 50% del área foliar verde (Tabla 3). A partir de los dos meses se agudizó el deterioro de las plantas por lo que se continuaron las evaluaciones.

Tabla 3. Comportamiento del estado fisiológico (%) de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (IBP 87-100) utilizando diferentes concentraciones de la formulación White en el medio de cultivo.

Sales (%)	Temp (°C)	Período de conservación (meses)			
		1		2	
		I	II	I	II
75	26	100a	-	-	100a
75	18	100a	-	69.2a	30.8 d
100	26	100a	-	15.4c	84.6b
100	18	100a	-	33.3b	66.7c
125	26	100a	-	25.0bc	75bc
125	18	100a	-	30.8b	69.2bc

Medias con letras iguales en una columna no difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba el test de Tukey.

I. Porcentaje de plantas con el 75 % del área foliar verde.

II. Porcentaje de plantas con el 50 % y menos del área foliar verde.

## CONCLUSIONES

La conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar IBP 87-100 fue posible utilizando la formulación salina propuesta por MS reducida al 25 y 50% de su concentración total, asociada a 18°C de temperatura de cultivo. De esta manera el crecimiento de las plantas fue lento y fueron menores los daños fisiológicos, lo que favoreció su longevidad. Estas plantas pudieron ser conservadas durante seis meses consecutivos sin la necesidad de transferencias a medios de cultivo fresco, con porcentajes de supervivencias entre el 58.3 y 69.2%. Las plantas conservadas en la formulación White solo pudieron ser mantenidas durante dos meses con más del 50% del área foliar seca. Este comportamiento pudo estar dado por los bajos niveles de nitrógeno que contiene esta formulación.

## REFERENCIAS

Alvarado, Y, Portal N, García L, Martínez Y, Freire M, Quiala E, Pichardo T y Herrera I (2001). Control de la contaminación bacteriana en la semilla artificial de caña de azúcar a través de métodos de detección temprana. *Biotecnología Vegetal*. 1(1): 57-60

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. Facultad de ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. 93p Santa Clara

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays wiht tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

Pérez, OG, Bernal LN, China MA, O'Relly LJ y De Prada EF (1997) Conservación del germoplasma. En: JF Valdés (Ed.) Recursos Genéticos de la caña de azúcar, pp 22-25 INCA. Habana

Pinto de Lemos, EE (2002) Conservación *in vitro* de germoplasma de caña de azúcar. *Pesquisa agropecuario. Brasil* 37(10):1-7

Roca, WM, Escobar R, Mafla G (1994) Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. pp8-12. CIAT. Cali

Suksa, PA, Kataoka I, Fujime Y, Subhadrabandhu S (1997) Effect of Temperature, Growth Retardants and Osmotic potential on growth of Papaya shoots conserved *in vitro*. *Tropical Agriculture* 41(1):7-13

Srenivasan, TV y Srenivasan J (1985) *In vitro* sugarcane germplasm storage. *Sugar Cane* Jan/Feb: 11: 1-3

Taylor, PWJ (1997) *In vitro* germplasm conservation of sugarcane cultivars, basic sugarcane species and related genera. *Plant Molecular Genetics and Germplasm Development Group* 8: 243-256

Toledo, J y Golmirzaie A (1998) Conservación *in vitro* de *Solanum* spp bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Habana. Cuba

White, PR (1963) The cultivation of animal and plant cell. Ronal Press, New York.