

Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar

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.co.cu

RESUMEN

El desarrollo de técnicas para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales proporciona nuevas alternativas para la conservación *ex situ* el germoplasma de la caña de azúcar. Este trabajo tuvo como objetivo determinar las condiciones de cultivo para la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar, a través del estudio de la temperatura de cultivo, la concentración salina y de manitol en el medio de cultivo. Para ello, se seleccionaron plantas de 2.0 cm de altura en fase de multiplicación de la variedad C 87-51 y se incubaron a 12, 15 y 18 \pm 2.0 °C. Se utilizó la formulación MS al 25, 50, 75 y 100% de su concentración, complementada con diferentes concentraciones de manitol (0, 10, 20, 30 g.l⁻¹). Las evaluaciones se realizaron a partir de los dos y hasta los 12 meses y se determinó el porcentaje de supervivencia de las plantas, así como, la altura y el número de brotes. Transcurrido este período se obtuvo como resultado la conservación de las plantas durante 12 meses consecutivos a una temperatura de 15 °C. Los porcentajes de supervivencia estuvieron entre 53.3 y 86.6% cuando la concentración salina se redujo al 25 y 50% de su concentración total. La altura de las plantas disminuyó con el incremento de las concentraciones de manitol, sin embargo, aumentó el número de brotes por planta en los tratamientos que contenían este regulador osmótico.

Palabras clave: crecimiento mínimo, manitol, supervivencia, temperatura de cultivo

ABSTRACT

The development of *in vitro* culture techniques for plant tissues provides new alternatives for *ex situ* conservation of sugarcane germplasm. The aim of this paper was to determine the conditions for *in vitro* conservation of sugar cane plants; culture temperature, saline and manitol concentration in the culture medium were evaluated. *In vitro* plants of 2 cm height form cultivar C 87-51 in multiplication were incubated at 12, 15 and 18 \pm 2.0 °C. The MS formulation (25, 50, 75 and 100 % of its original concentration) was complemented with different concentrations of manitol (0, 10, 20, 30 g.l⁻¹). After two months of conservation initial 12 months the percentage of plants survival, the height and the number of shoots per plant were evaluated. It was possible to conserve *in vitro* plants of sugarcane for 12 months at 15 °C. The percentage of plants survival rated between 53.3 and 86.6 %. The plants height decreased with the increment of the manitol concentration; nevertheless the number of shoots per plant was higher in treatments including this osmotic regulator.

Key words: culture temperature, manitol, minimal growth, survival

INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos de caña de azúcar constituyen la base del desarrollo de los programas de mejoramiento genético y de producción de semilla en esta especie. En Cuba el banco de germoplasma en campo de caña de azúcar ha llegado a contar con más de 2700 accesiones que incluyen especies originales, híbridos nacionales o extranjeros y géneros afines. Esta cifra aumenta sistemáticamente, a partir de las nuevas variedades que surgen del programa de mejoramiento genético y del intercambio con otros países (Pérez, 1997).

Una alternativa para la conservación de los recursos fitogenéticos la constituye la conservación *in vitro*,

la cual es un auxiliar valioso de la conservación en campo ya que permite tener duplicados seguros de los diferentes genotipos. Puede aplicarse, además, en especies donde se encuentra establecida la propagación por métodos biotecnológicos. El método de crecimiento mínimo y la crioconservación garantizan la conservación *in vitro* durante períodos medianos (1 a 2 años) y prolongados de tiempo, respectivamente (Kartha, 1987). El crecimiento mínimo ha sido utilizado para conservar cultivos de yemas en varias especies (Withers y Williams, 1990). Según, Malaurie *et al.* (1998) cerca de 20 especies han sido conservadas en el Instituto de Investigaciones para el Desarrollo (por sus siglas en francés IRD), en condiciones de crecimiento mínimo.

La forma más utilizada de retardar el crecimiento vegetal es a través de la reducción de la

temperatura de cultivo y la concentración mineral del medio de cultivo. La combinación de estos factores unido a la adición de reguladores osmóticos en el medio de cultivo constituye la base de los protocolos de conservación por crecimiento mínimo. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer las condiciones de cultivo para la conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar, a través del estudio de la temperatura de cultivo, la concentración salina y de manitol en el medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los experimentos se utilizaron plantas *in vitro* en fase de multiplicación de la variedad C 87-51. El medio de cultivo de multiplicación contenía los elementos minerales propuestos por Murashige y Skoog (1962) (MS), complementados con 0.2 mg.l⁻¹ de 6-benzilamino purina (6-BAP) (Jiménez, 1995). Las condiciones de cultivo se desarrollaron a una temperatura de 26 ± 2.0 °C en cámaras de crecimiento con iluminación solar e intensidad luminosa que oscilaba entre 100 y 125 μmol⁻²s⁻¹.

Las plantas fueron diagnosticadas después del tercer subcultivo *in vitro* para la presencia de microorganismos fitopatógenos como *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas vasculorum* pv *campestris*, Virus del Mosaico de la caña de azúcar (VMCA) y Virus Baciliforme de la caña de azúcar (VBCA). Además, se sometieron a la detección de contaminantes bacterianos, a través de la utilización del medio de cultivo Agar de Wilbrink (Alvarado *et al.*, 2001). Las plantas negativas fueron utilizadas en los estudios de conservación *in vitro*.

Influencia de la temperatura de cultivo en la supervivencia de las plantas conservadas *in vitro*

Para estudiar la influencia de la temperatura de cultivo en la conservación de las plantas *in vitro* de caña de azúcar se seleccionaron plantas jóvenes de aproximadamente 2.0 cm de altura. Se colocó una planta por tubo de ensayo (14.5 x 2.0 cm), que contenía 15 ml de medio de cultivo semisólido (5 g.l⁻¹ de agar tipo extra fuerte BIOCEN). El mismo contenía el 100% de las sales MS, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y carecía de reguladores del crecimiento.

Las temperaturas de cultivo estudiadas fueron inferiores a la óptima para el crecimiento activo con el objetivo de retardar el crecimiento de las plantas y de esta forma favorecer su conservación. Estas fueron 12, 15 y 18 ± 2.0 °C, para lo cual se colocaron las plantas en cámaras climatizadas (Modelo Koxka), con un fotoperíodo de 16 horas luz e intensidad luminosa de 30 μmolm⁻²s⁻¹. Se

utilizaron como control las plantas conservadas a 18 ± 2.0 °C por ser la de mejores resultados en estudios preliminares de conservación *in vitro*, en las cuales se utilizó esta temperatura como valor mínimo. Las evaluaciones se realizaron entre los dos y hasta los 12 meses y se determinó el porcentaje de supervivencia de las plantas conservadas *in vitro*.

En cada una de las variantes estudiadas se consideraron 30 plantas como réplica y el experimento se repitió en dos ocasiones. El porcentaje de supervivencia de las plantas conservadas se analizó estadísticamente mediante la prueba de comparación de proporciones ANDEVAP, complementada con la prueba de Fisher.

Influencia de la concentración salina y de manitol en la supervivencia de las plantas conservadas *in vitro*.

Se estudiaron las sales MS al 25, 50, 75 y 100% de su concentración original, complementadas con diferentes concentraciones de manitol (0, 10, 20, 30 g.l⁻¹), con el objetivo de incrementar el contenido osmótico de los medios de cultivo y disminuir la absorción de nutrientes por las plantas. Como control se utilizó la mejor temperatura del experimento anterior asociada al uso de las sales MS al 100%.

Durante el período de conservación se observó el comportamiento de las plantas en los diferentes tratamientos y a los 12 meses se determinó el porcentaje de supervivencia, así como, el crecimiento y desarrollo vegetal determinado por la altura y el número de brotes por planta. El análisis estadístico de los porcentajes de supervivencia se efectuó similar al experimento anterior. Los valores de altura y número de brotes de las plantas conservadas se procesaron a través de un análisis de varianza bifactorial y la diferencia entre las medias se determinó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de la temperatura de cultivo en la supervivencia de las plantas conservadas *in vitro*

El período de conservación y la temperatura de cultivo tuvieron una influencia significativa en la supervivencia de las plantas conservadas. El mayor período de conservación (12 meses) se alcanzó en las plantas conservadas a 15 °C, aunque con bajo porcentaje de supervivencia (20%). De forma general esta variable disminuyó en la medida que aumentó el período de conservación (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia de la temperatura de cultivo sobre el porcentaje de supervivencia de plantas conservadas *in vitro* de caña de azúcar variedad C 87-51.

Temperatura	Período de conservación (meses)			
	2	6	8	12
12 °C	66.6 b	13.3 c	0.0 c	0.0 b
15 °C	86.6 a	80.0 a	53.3	20.0 a
18 °C	86.6 a	66.6 b	20.0 b	0.0 b

Medias con letras iguales en la misma columna no difieren estadísticamente según la prueba de Fisher para $p < 0.05$.

Sin embargo, Withers (1985) sugirió la reducción de la temperatura entre 15 y 25°C para cultivos de clima tropical cuando el objetivo era disminuir el crecimiento de los explantes cultivados *in vitro*. Por ejemplo, en la conservación de ápices de papaya (*Carica papaya*) Suksa *et al.* (1997) lograron elevados porcentajes de supervivencia después de 12 meses de cultivo a 16 °C.

El uso de temperaturas bajas durante el cultivo *in vitro* reduce el metabolismo celular de las plantas. Sin embargo, la supervivencia de las plantas conservadas a 12 °C disminuyó después de los seis meses de conservación observándose amarillamiento y muerte total. Las plantas conservadas a 18 °C mantuvieron más del 50% de supervivencia a los seis meses. Su deterioro se presentó a partir de los ocho meses y estuvo dado por el alto ritmo de crecimiento mantenido durante el período de conservación (Tabla 1).

La caña de azúcar es una planta tropical de metabolismo C4 que requiere una temperatura por encima de los 26 °C. Lemos *et al.* (2002) refirieron como inadecuada 12°C para mantener la viabilidad de explantes durante la conservación *in vitro* de caña de azúcar, lo cual fue corroborado en este estudio.

Influencia de la concentración salina y de manitol en la supervivencia de las plantas conservadas *in vitro*

La reducción de la concentración de sales minerales en el medio de cultivo asociada a una temperatura de cultivo de 15 °C determinó el incremento de la supervivencia de las plantas conservadas. Los mejores valores de la misma después de 12 meses consecutivos de conservación no estuvieron condicionados a la presencia del regulador osmótico (manitol) (Figura 1). Este comportamiento puede ser explicado por la disponibilidad en la caña de azúcar de mecanismos necesarios para metabolizar los azúcares alcoholes como el manitol y sorbitol (Coffin *et al.*, 1976, citado por Lemos *et al.*, 2002).

La eficiencia de la conservación, dada por el comportamiento de la supervivencia, se incrementó cuando la concentración de sales minerales de los medios de cultivo se redujo al 25 y 50 % de su concentración original, y se alcanzaron valores entre 53.3 y 86.6 % (Figura 1).

Durante la conservación de las plantas de caña de azúcar a 15 °C se observó, a los 12 meses, una

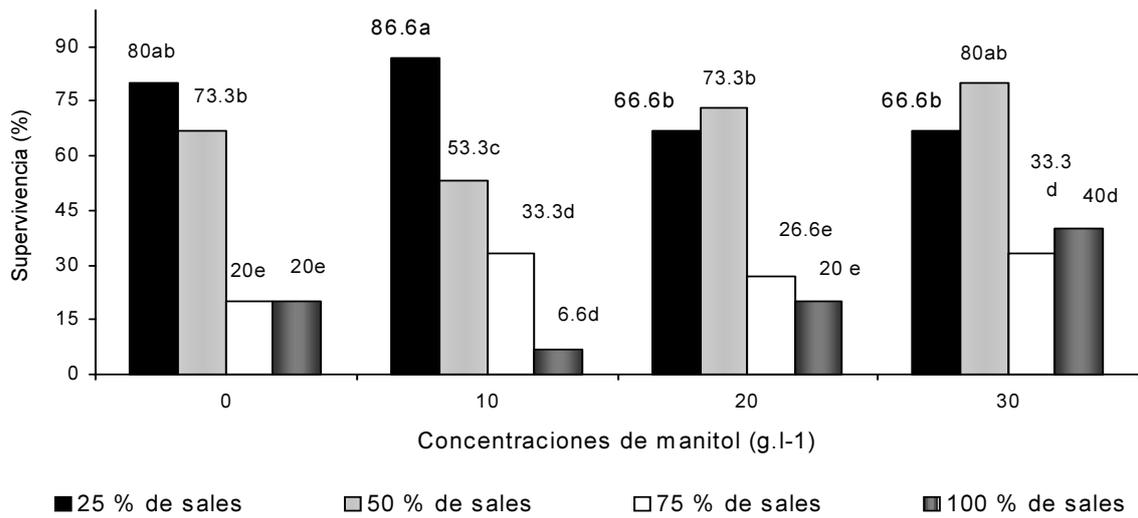
disminución en la altura cuando se utilizó la menor concentración de salina, correspondiente al 25 % (Figura 2). Este resultado corroboró lo planteado por varios autores, los cuales han afirmado que la disminución del contenido mineral en los medios de cultivo favorece el retardo del crecimiento debido a las alteraciones que ocurren en el metabolismo celular (Kartha, 1981; Staritsky *et al.*, 1986).

A pesar de que las concentraciones de manitol no determinaron el incremento de la supervivencia de las plantas conservadas tampoco resultó perjudicial y se observó una influencia en la altura y en el número de brotes en las mismas (Figuras 2 y 3). Sin embargo, otros autores han referido efectos nocivos asociados a este regulador osmótico durante la conservación *in vitro* de caña de azúcar (Lemo *et al.*, 2002).

Se observó, además, una disminución en la altura de las plantas cuando las concentraciones de manitol fueron combinadas con concentraciones minerales menores del 100 %. No obstante, la altura tendió a disminuir proporcionalmente con el incremento de la concentración de manitol (Figura 2). Los reguladores osmóticos (Sorbitol 4 g.l⁻¹) han sido empleados en la conservación de accesiones de papa, por favorecer la reducción del crecimiento y prolongar el período entre subcultivos (Toledo y Golmirzaie, 1998).

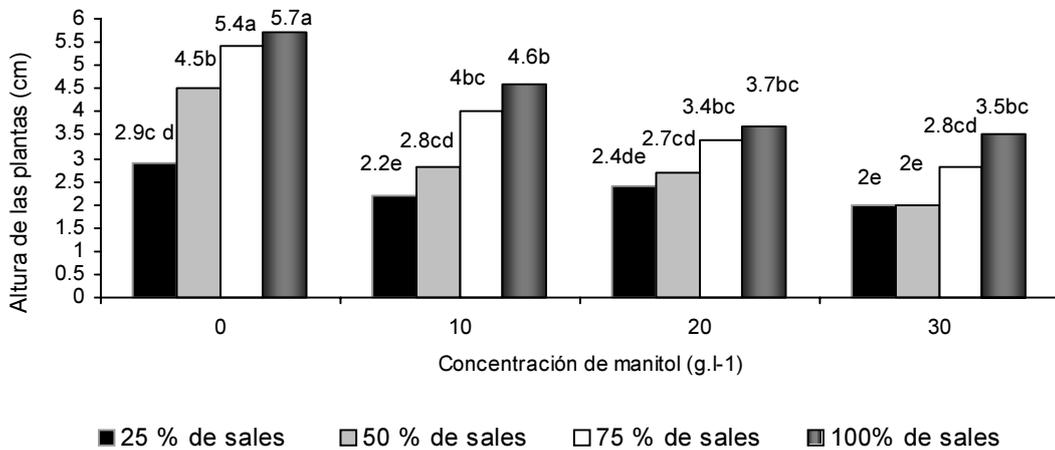
La presencia de brotes resultó una característica distintiva en cada uno de los tratamientos, sobre todo en los que el manitol se encontraba presente. De forma general, se observó un estímulo significativo en la inducción de brotes axilares en los tratamientos que contenían diferentes concentraciones de manitol, independientemente de la concentración de sales minerales del medio de cultivo (Figura 3). Lemos (1998), refirió la presencia de brotes axilares en plantas de caña de azúcar a los tres meses de conservados, cuando utilizó el total de las sales MS.

Este regulador osmótico ocasionó a las plantas conservadas a 15 °C una relación inversa entre la altura y el número de brotes a favor de la supervivencia de las plantas, o sea, a menor altura y mayor número de brotes se favoreció la longevidad y con ella la conservación de las plantas de caña de azúcar. Tras el período de conservación las plantas fueron cultivadas en medio de cultivo fresco de multiplicación y se obtuvieron nuevos brotes a las tres semanas, los cuales fueron propagados en condiciones normales de crecimiento.



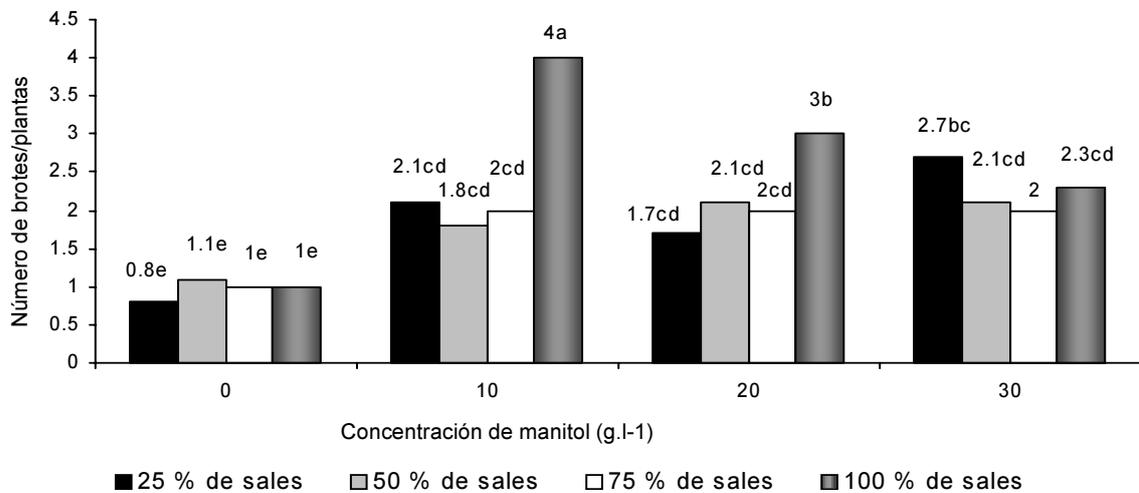
Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según la prueba de Fisher para $p < 0.05$.

Figura 1. Influencia de la concentración salina (Sales MS) y de manitol en la supervivencia de plantas de caña de azúcar variedad C 87-51 conservadas durante 12 meses.



Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p < 0.05$.

Figura 2. Influencia de la concentración salina (Sales MS) y el manitol en la altura de plantas de caña de azúcar variedad C87-51 conservadas durante 12 meses.



Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p < 0.05$.

Figura 3. Influencia de la concentración salina (Sales MS) y el manitol en el número de brotes por planta de caña de azúcar variedad C 87-51 conservadas durante 12 meses.

CONCLUSIONES

Las plantas *in vitro* de caña de azúcar de la variedad C 87-51 pudieron ser conservadas durante 12 meses consecutivos a una temperatura de 15 °C. El crecimiento se redujo con el incremento de las concentraciones de manitol y pudo ser constatado a través de la disminución de la altura de las plantas conservadas. Sin embargo, se presentó un incremento en el número de brotes en los tratamientos que contenían el regulador osmótico independientemente de la concentración presente. Transcurridos varios meses las plantas inicialmente colocadas en las condiciones de conservación murieron y los brotes jóvenes garantizaron la supervivencia del material vegetal conservado. La disminución de la altura unida a la presencia de brotes axilares favoreció la longevidad de las plantas y su conservación.

REFERENCIAS

- Alvarado, Y, Portal N, García L, Martínez Y, Freire M, Quijala E, Pichardo T, 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
- Kartha KK (1981) Genepool conservation through tissue culture. En: AN Rao (ed.), Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants, pp. 213-218. BLS. New York
- Kartha KK (1987) Advances in the cryopreservation technology of plant cells and organs. En: Allen NS (Ed.). Plant biology. V3, pp. 447-458. BLS. New York
- Lemos, EE, Ferreira M, Calheiros L M, Ramalho C E, Alburquerque M (2002) Conservación *in vitro* de germoplasma de caña de azúcar. *Pesquisa Agropecuaria* 47(10):1359-1364
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497
- Malaurie, B, Trouslot MF, Berthaud J, Bousalem M, Pinel A, Durern J (1998) Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp)germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(3). Disponible en: <http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/3/index.html>.
- Pérez, OG, Bernal LN, China MA, O'Reilly L J, De Prada EF (1997) Conservación del germoplasma. En: JF Valdés (ed.) Recursos Genéticos de la caña de azúcar, pp. 22-25. Imago. Ciudad de la Habana
- Suksa, PAM, 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.
- Staritsky, G, Dekkers AJ, Louwaars NP, Zandvoort EA (1986) *In vitro* conservation of aroid germplasm at reduced temperatures and under osmotic stress. En: Withers, LA y Alderson PG (eds.) Plant Tissue Culture and Agriculture Applications, pp. 277-283. Butterworths
- 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. Habana. Cuba
- Withers, L, Williams JT (1990) Germplasm conservation *in vitro* and cryopreservation. En: Torres AC y Caldas L S (eds) Técnicas y Aplicaciones del cultivo de tejidos de plantas, pp. 297-286. Emprapa-SPI/Emprapa-CNPq. Brasilia