

FitoMas-E: una alternativa para el enraizamiento *in vitro* de cultivares de caña de azúcar

Carlos Fernando Reyes Esquirol, Pablo Machado Armas, Aydiloide Bernal Villegas, Zenaida Occeguera Águila, Rafael Gómez-Kosky, Félix R Díaz Mujica, Osmany Adayáz, Ana Rosa Hernández Freire

Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) Centro Villa Clara. Autopista Nacional km 246. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba. CP 53100. e-mail: carlos.reyes@inicavc.azcuca.cu

RESUMEN

FitoMas-E incrementa y acelera la germinación de las semillas, estimula el desarrollo de las raíces, tallos, hojas y mejora la nutrición de las plantas. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del FitoMas-E sobre el enraizamiento *in vitro* de caña de azúcar cv. 'CP52-43', 'C87-51' y 'C1051-73'. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con cuatro tratamientos, tres concentraciones de FitoMas-E (0.5, 1.0 y 1.5 ml l⁻¹) y 1.3 mg l⁻¹ de ácido indolacético como control en el medio de cultivo líquido, con cinco repeticiones. A los 15 días de cultivo se cuantificó el número de brotes con raíz, longitud de las raíces, altura del brote y el número de hojas. En la fase de aclimatización *ex vitro*, se cuantificó el número de plantas con cepellón, número de hojas, raíces y se midió la altura de la planta a los 45 días de trasplantadas. Los resultados mostraron que el FitoMas-E en los cultivares 'CP52-43' y 'C87-51' logró un número de brotes con raíz similar al control y en 'C1051-73' lo superó con la concentración de 0.5 ml l⁻¹ de este bioestimulante. La altura del brote, el número de hojas y la longitud de la raíz, alcanzaron valores significativamente superiores al control, con 1.0 ml l⁻¹ del fitoestimulante, excepto en 'CP52-43' donde se logró longitud de la raíz similar entre tratamientos. En la fase de aclimatización *ex vitro* las plantas *in vitro* enraizadas con el FitoMas-E lograron los parámetros de calidad requeridos y superaron a los controles para las variables altura, número de raíces y longitud de la raíz más larga. Entre genotipos hubo diferencias significativas para todos los cultivares.

Palabras clave: aclimatización *ex vitro*, cultivo *in vitro*, *Saccharum* spp.

FitoMas-E: an alternative for *in vitro* rooting of sugarcane cultivars

ABSTRACT

FitoMas-E increases and accelerates the germination of the seeds, stimulates the development of roots, stems, leaves and improves the nutrition of plants. The objective of this work was to evaluate the effect of FitoMas-E on the *in vitro* rooting of sugarcane cultivars 'CP52-43', 'C87-51' and 'C1051-73'. A completely randomized experimental design was used with four treatments, three concentrations of FitoMas-E (0.5, 1.0 and 1.5 ml l⁻¹) and indoleacetic acid (IAA) 1.3 mg l⁻¹ as control in the liquid culture medium, with five repetition. At 15 days of culture the number of rooted shoots, height, leaves number and length of roots were evaluated. In the *ex vitro* acclimatization stage, its were quantified the number of plants with root, leaves and roots number per plant and it was measured the height after 45 days of transplanted. The results showed that the FitoMas-E in the cultivars 'CP52-43' and 'C87-51' achieved a number of shoots with a root similar to the control and in 'C1051-73' it exceeded it with the concentration of 0.5 ml l⁻¹ of this biostimulant. Leaf height, leaves number and root length reached values significantly higher than control, with 1.0 ml l⁻¹ phytostimulant, except for 'CP52-43' where similar root length was achieved among treatments. In the *ex vitro* acclimatization stage the *in vitro* plants rooted with the FitoMas-E achieved the required quality parameters, exceeding the controls for the variables height, number of roots and length of the longest root. Among genotypes there were significant differences for all cultivars.

Keywords: *in vitro* culture, micropropagation, *Saccharum* spp.

INTRODUCCIÓN

El FitoMas-E (ICIDCA, Cuba) es un producto orgánico obtenido a partir de los desechos de la industria azucarera. Sus efectos principales

son incrementar y acelerar la germinación de las semillas, estimular el desarrollo de las raíces, tallos, hojas y mejorar la nutrición, entre otras cualidades. Como principales componentes tiene aminoácidos que influyen

en el metabolismo de las plantas dentro los que se encuentran prolina, glicina, el ácido glutámico y el triptófano, este último es precursor del ácido indolacético (AIA), regulador del crecimiento que interviene en el proceso de enraizamiento de las plantas (Viñals *et al.*, 2011).

Este producto se ha empleado en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en condiciones de campo y en diferentes cepas con resultados satisfactorio (Gallegos, 2016).

En la biofábrica del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) se prueban diferentes alternativas para mejorar la uniformidad en el enraizamiento de los cultivares que en ella se propagan *in vitro*. En este sentido, Reyes *et al.* (2014) informaron que en estudios realizados con FitoMas-E en el enraizamiento *in vitro* de brotes de caña de azúcar cv. 'C95-414', alcanzaron resultados significativamente superiores a los obtenidos con AIA, en cuanto al número de brotes enraizados, altura y longitud de la hoja +1 con 1.0 ml l⁻¹ de este bioestimulante. En la fase de aclimatación las plantas *in vitro* lograron la calidad requerida para su comercialización.

Sin embargo, se conoce que en el cultivo *in vitro* el genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para el establecimiento en condiciones *in vitro*, la multiplicación, o diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Radice, 2010). Por esta razón es necesario estudiar el efecto del genotipo para generalizar el empleo de una sustancia determinada y su concentración en el medio de cultivo para el enraizamiento *in vitro*.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de FitoMas-E en el enraizamiento *in vitro* de diferentes cultivares de caña de azúcar 'CP52-43', 'C87-51' y 'C1051-73' y su respuesta en la aclimatación *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la biofábrica, ubicada en la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) Centro Villa Clara.

Material vegetal

Se utilizaron brotes *in vitro* de 2-4 cm de los cultivares de caña de azúcar 'CP52-43', 'C87-

51' y 'C1051-73' obtenidos en el octavo subcultivo de multiplicación según metodología propuesta por Jiménez *et al.* (1997).

Enraizamiento *in vitro*

El medio de cultivo de enraizamiento en estado líquido estuvo compuesto por las sales MS al 100% (Murashige y Skoog, 1962), enriquecidas con 50 mg l⁻¹ de ácido cítrico, 40 g l⁻¹ de sacarosa y 1.3 mg l⁻¹ de AIA, el pH fue ajustado a 5.8.

La esterilización del medio de cultivo se realizó a través de ebullición durante cuatro minutos y se distribuyó en los frascos de cultivo de plástico no esterilizables por autoclave. Estos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.03% (v/v) y se enjuagaron los accesorios con agua desionizada.

Los brotes *in vitro* se colocaron en cámara de crecimiento a 26-28 °C y la densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos fue de 17.1 a 64.6 μmol m⁻² s⁻¹. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y cinco repeticiones para cada cultivar, tres concentraciones de FitoMas-E (0.5, 1.0, 1.5 ml l⁻¹) y un control (1.3 mg l⁻¹ de AIA). Se colocaron 15 brotes *in vitro* en frascos con 90 ml de medio de cultivo cada uno. A los 15 días de cultivo, se cuantificó el número de brotes enraizados y se seleccionaron 15 de ellos por tratamiento en cada cultivar, a los que se les midió la altura (cm) desde la base del brotes hasta la base de la hoja +1 y la longitud de la raíz más larga (cm) y se cuantificó el número de hojas.

Aclimatación *ex vitro*

Las plantas *in vitro* fueron transferidas a la fase de aclimatación en condiciones de umbráculo. Este se encontraba cubierto con una malla sombra de color negro (Sarán) que permite la reducción al 50% de la intensidad luminosa. Se colocaron en bandejas plásticas de 60 alveolos con capacidad cada uno para 143 cm³ de sustrato. Cada bandeja significó un tratamiento en cada cultivar. Se utilizó como sustrato compost a partir de cachaza de restos de la caña de azúcar, al que se le añadió zeolita en proporción de 3:1 (v/v). Durante la estancia de las plantas *in vitro* en esta fase fueron atendidas según el manual de procedimientos establecido (Jorge *et al.*, 2011). A los 15 días del trasplante se realizó una evaluación de

supervivencia y a los 45 días de cultivo, se seleccionaron 20 plantas de cada cultivar por tratamiento y se midió la altura (cm) y la longitud de la raíz más larga (cm), se cuantificó el número de hojas, el número de raíces y se observó la formación o no del cepellón.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows versión 21 y el Programa Stat-graphics Centurión 2007 versión 15. Para el análisis de la normalidad de las variables se utilizó la prueba de Shapiro Wilk, para la comparación entre las medias se aplicó la alternativa no paramétrica del Análisis de Varianzas, la prueba de Kruskal Wallis y para la comparación entre parejas de grupos se utilizó la prueba de Mann Whitney. El experimento fue repetido dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Enraizamiento *in vitro*

Para la variable número de brotes que formaron raíces no se alcanzaron diferencias significativas para las distintas concentraciones de FitoMas-E en los cultivares 'CP52-43' y

'C87-51' con respecto al control, sin bioestimulante. Sin embargo, para el cultivar 'C1051-73' los mejores resultados se obtuvieron en la concentración de 0.5 ml l⁻¹ de FitoMas-E con diferencias significativas, con el resto de los tratamientos para este cultivar y el control (Tabla 1).

Con relación a la altura el mejor resultado fue obtenido en el cultivar 'C87-51' al emplear la concentración de 1.0 ml l⁻¹ del bioestimulante con diferencias significativas con todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, las mejores concentraciones del FitoMas-E para los cultivares 'CP52-43' y 'C1051-73' fueron de 1.0 y 0.5 ml l⁻¹ respectivamente sin diferencias significativas entre ambos tratamientos (Tabla 1).

El número de hojas en los brotes *in vitro* enraizados alcanzan los mejores resultados para la concentración de 1.0 ml l⁻¹ en los cultivares 'C87-51' y 'CP52-43' y las dos concentraciones restantes de FitoMas-E igualaron al control, con la excepción de 'C1051-73' que lo superó significativamente (Tabla 2).

Para la variable longitud de la raíz en el cultivar 'C1051-73' la concentración de 0.5 ml l⁻¹ se

Tabla 1. Efecto del FitoMas-E sobre las variables enraizamiento y altura de los brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a los 15 días de cultivo.

Tratamientos	Cultivar	Brotes con raíz (%)	Altura del brote (cm)
1.3 mg l ⁻¹ de AIA (Control)	'CP52-43'	96.5 a	4.11 cd
	'C87-51'	100.0 a	3.85 de
	'C1051-73'	75.8 c	3.46 e
0.5 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'CP52-43'	97.4 a	4.43 bc
	'C87-51'	98.6 a	4.35 bc
	'C1051-73'	84.0 b	4.35 bc
1.0 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'CP52-43'	98.6 a	4.53 b
	'C87-51'	100.0 a	5.47 a
	'C1051-73'	69.6 c	4.16 cd
1.5 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'CP52-43'	95.6 a	2.80 f
	'C87-51'	95.8 a	4.69 b
	C1051-73	73.4 c	4.11 cd
EE		90 ± 2.2	4.19 ± 0.8
CV		11.7	10.6

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0.05$ ($n=30$) EE. Error Estándar, CV. Coeficiente de Variación

alcanzaron los mejores resultados de conjunto con 1.5 ml l⁻¹ sin diferencias significativas entre ellos y si con el resto de los tratamientos. Sin embargo para el cultivar 'C87-51' la mayor longitud de la raíz en los brotes enraizados se logró con la concentración de 1.0 ml l⁻¹ sin diferencias significativas con las concentraciones anteriormente señaladas. No obstante para 'CP52-43' ninguna de las concentraciones de FitoMas-E tuvo un efecto positivo sobre la longitud de la raíz más larga sin diferencias significativas con el control (Tabla 2).

Estos resultados evidencian el efecto del genotipo en el enraizamiento *in vitro* de los diferentes cultivares de caña de azúcar estudiados con el empleo de diferentes concentraciones del bioestimulante FitoMas-E.

La respuesta de estos cultivares en el enraizamiento de los brotes *in vitro* y su desarrollo con el FitoMas-E como sustancia enraizadora pueden ser debido a la composición química del bioestimulante, donde entre sus principales componentes se encuentran los aminoácidos que influyen en el metabolismo de las plantas y fundamentalmente el triptófano, precursor de la síntesis del AIA (Gallegos, 2016).

Hasta el momento solo se informa un trabajo de Reyes *et al.* (2014) en el cultivar 'C95-414' de caña de azúcar para incrementar el enraizamiento *in vitro* empleando en el medio de cultivo FitoMas-E. Los mejores resultados con este producto se alcanzaron con la concentración 1.0 ml l⁻¹ de este bioestimulante para iguales variables del presente trabajo.

El genotipo también tiene una importancia clave en el proceso de enraizamiento. Según De Souza y Grasso (2012) existen varias evidencias de que la formación de raíces en los segmentos de tallos o brotes *in vitro* es genéticamente controlada. La gran variación observada en especies, cultivares y clones en relación con la mayor o menor capacidad natural de formación de raíces ha demostrado la importancia de los factores genéticos en el enraizamiento.

Aclimatización *ex vitro*

Los mayores valores de altura se obtuvieron en el cultivar 'CP52-43' para las tres concentraciones de FitoMas-E adicionadas al medio de cultivo de enraizamiento junto con el cultivar 'C1051-73' para las concentraciones de 1.0 y 1.5 ml l⁻¹ sin diferencias significativas entre ellos pero si

Tabla 2. Efecto del FitoMas-E sobre las variables número de hojas activas y longitud de la raíz, de brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a los 15 días de cultivo.

Tratamientos	Cultivar	Número de hojas	Longitud de la raíz (cm)
1.3mg l ⁻¹ de AIA (Control)	'CP52-43'	3.3 b	1.35 ef
	'C87-51'	3.0 b	2.33 c
	'C1051-73'	2.5 c	1.91 d
0.5 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'CP52-43'	3.1 b	1.27 f
	'C87-51'	2.9 b	2.42 c
	'C1051-73'	3.0 b	2.75 ab
1.0 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'CP52-43'	3.4 a	1.40 ef
	'C87-51'	3.7 a	2.75 ab
	'C1051-73'	3.1 b	2.75 ab
1.5 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'CP52-43'	3.1 b	1.39 ef
	'C87-51'	2.9 b	2.61 bc
	'C1051-73'	3.0 b	2.97 a
EE		3 ± 0.23	24.85 ± 0.32
CV		13	12

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para p<0.05 (n=30) EE. Error Estándar, CV. Coeficiente de Variación

Tabla 3. Efecto del empleo del FitoMas-E sobre las variables morfológicas de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a los 45 días de cultivo en la fase de aclimatización *ex vitro*.

Tratamientos	Cultivar	AP	NR	LR	NH
1.3 mg l ⁻¹ de AIA (Control)	'CP52-43'	11.51 e	9.20 c	12.41 cd	4.75 a
	'C87-51'	14.67 bc	8.85 d	13.37 bc	4.30 ab
	'C1051-73'	14.10 cd	10.20 a	11.49 d	4.75 a
0.5 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'CP52-43'	11.62 e	10.50 ab	13.45 bc	5.00 a
	'C87-51'	16.66 a	10.80 a	13.88 ab	4.65 ab
1.0 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'C1051-73'	12.87 de	10.20 ab	11.83 d	4.55 ab
	'CP52-43'	12.61 de	10.60 a	13.38 bc	5.00 a
	'C87-51'	16.81 a	10.70 a	13.22 bc	4.70 ab
1.5 ml l ⁻¹ de FitoMas-E	'C1051-73'	16.24 ab	11.00 a	14.68 a	4.70 ab
	'CP52-43'	13.36 cd	11.00 a	13.05 bc	5.00 a
	'C87-51'	16.30 a	9.45 b	13.18 bc	4.55 ab
	'C1051-73'	16.36 a	10.70 a	13.25 bc	4.70 ab
EE		14.4± 1.5	10.30±1.0	1.01± 1.5	4.7± 0.2
CV		10.47	14.84	8.59	8.96

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren significativamente según prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0.05$ ($n=40$) EE. Error Estándar, CV. Coeficiente de Variación. Leyenda: AP= Altura de la planta (cm), NR= Número de raíces, LR= Longitud de la raíz más larga (cm), NH= Número de hojas

con el resto de los tratamientos. Respecto al número de raíces la mayoría de los tratamientos no tuvieron diferencias significativas entre ellos. Solo fueron superados los controles en los cultivares 'CP52-43' y 'C87-51', además del 'C87-51' en la concentración de 1.5 ml l⁻¹ del producto.

Para la variable longitud de la raíz más larga los mejores resultados estuvieron en los tratamientos con 0.5 ml l⁻¹ y 1.0 ml l⁻¹ en los cultivares 'C87-51' y 'C1051-73' respectivamente con diferencias significativas con el resto de los tratamientos evaluados. El número de hojas en los tres cultivares fue similar entre el FitoMas-E y el AIA, sin diferencias significativas (Tabla 3).

El número y longitud de las raíces en esta fase aunque presentó diferencias entre los tratamientos y cultivares hay que tener en cuenta que las plantas *in vitro* debido a su adaptación desarrollan nuevas raíces. Las plantas *in vitro* alcanzaron una altura entre 11.6 y 16.8 cm y entre cuatro y cinco hojas activas y todas formaron un buen cepellón 45 días después de ser trasplantadas. Con ello se lograron los indicadores de calidad exigidos

para su comercialización según se describen en los requisitos de calidad para plantas *in vitro* de caña de azúcar (Hernández *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

La adición del FitoMas-E en sus diferentes concentraciones mostró la influencia del genotipo en el enraizamiento *in vitro* de los brotes de caña de azúcar estudiados. Se lograron en el cultivar 'C1051-73' a la concentración de 0.5 ml l⁻¹ y para los cultivares 'C87-51' y 'CP52-43' en la concentración de 1.0 ml l⁻¹ los mejores resultados en condiciones de cultivo *in vitro*. En la fase de aclimatización *ex vitro* las plantas *in vitro* enraizadas con el FitoMas-E lograron los parámetros de calidad requeridos superando a los controles para las variables altura, número de raíces y longitud de la raíz más larga. Atendiendo a los resultados se corrobora que el FitoMas-E puede ser una alternativa para el enraizamiento *in vitro* de plantas de caña de azúcar.

REFERENCIAS

De Souza R, Grasso R (2012) Evaluación de un sistema de enraizamiento *in vitro* fotoautotrófico para

- Eucalyptus dunnii*. Tesis presentada para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
- Gallego R R (2016) Efecto de un fitoestimulante y la fertilización mineral sobre la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y algunas propiedades del suelo. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de la Habana, La Habana, Cuba
- Hernández A R, Machado C, Occeguera Z, Reyes C F, Bernal A, Delgado I, Más R (2014) Requisitos de calidad para vitroplantas de caña de azúcar. Centro Agrícola 41(4):39-43
- Jiménez E, García L, Suárez M, Alvarado Y (1997) Instructivo técnico para la micropropagación de la caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara
- Jorge H, Jorge I, Gómez J, Mesa J M, Bernal A (2011) Normas y Procedimientos del Programa de Fitomejoramiento de la Caña de Azúcar, Actualización 2011. PUBLINICA, La Habana
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 (3): 473-497; doi: 10.1111 /j.1399-3054
- Radice S (2010) Morfogénesis. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hoop E, Mroginski E (eds) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, pp. 26-33. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina
- Reyes C, Jiménez M, Bernal A, Montes de Oca JL, García JR (2014) Enraizamiento *in vitro* y posterior aclimatación del cultivar de caña de azúcar C95-414 con el bioestimulante cubano Fitomas–E. Centro Agrícola 41(4):39-43
- Viñals M, García A, Montano R L, Villar JC, García T, Ramil M (2011) Estimulante de crecimiento agrícola FITOMAS, resultados de producción del año 2010 y su impacto en cultivos seleccionados de alimentos. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar 45(3): 1-23

Recbido: 21-10-2016
Aceptado: 25-11-2016