

## COMPARACIÓN DE TRES SISTEMAS DE BIORREACTORES PARA LA MICROPROPAGACIÓN COMERCIAL DE CAÑA DE AZÚCAR

### COMPARISON OF THREE BIOREACTOR SYSTEMS FOR SUGAR CANE COMMERCIAL MICROPROPAGATION

Bello-Bello Jericó Jabín<sup>1</sup>, Martínez-Estrada Eduardo<sup>1</sup>, Morales-Ramos Victorino<sup>1</sup>, Caamal-Velázquez Humberto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de postgraduados Campus Córdoba. Carretera Córdoba Veracruz, km 348. C.P. 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz. jericobello@gmail.com

<sup>2</sup>Colegio de postgraduados Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná km 17.5 C. P. 24450, Champotón, Campeche.

La micropropagación de caña de azúcar es importante para la obtención de semilleros certificados: planta libre de patógenos, genéticamente homogénea y vigorizada, bajo condiciones *in vitro*. En este estudio se comparó la eficiencia de tres sistemas de biorreactores para la micropropagación de caña de azúcar variedad ITV 92-1424. A los 25 d de cultivo se evaluó el número y longitud de los brotes en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA), Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) y Biorreactores de Inmersión por Gravedad (BIG). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y comparación de medias de acuerdo a Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los resultados mostraron que no existe diferencia significativa en el número de brotes por explante bajo los diferentes sistemas de biorreactores evaluados, obteniendo entre 35-40 brotes por explante. Sin embargo, la mayor longitud de brotes se obtuvo en los sistemas BIT y BIG, con 6 y 8 cm de altura, respectivamente. Por lo anterior, a diferencia del RITA y BIT, debido a su bajo costo de implementación y fácil manejo, el BIG constituye una alternativa viable para la micropropagación a escala comercial de caña de azúcar.

**Palabras clave:** inmersión temporal, micropropagación comercial, semillero certificado.

Micropropagation of sugarcane is important for obtaining certified seed: pathogen-free plant, genetically homogeneous and vigorous under *in vitro* conditions. The efficiency of three bioreactor systems for micropropagation of sugarcane ITV 92-1424 variety was compared. After 25 d of culture, number and length of the shoots were assessed in Recipient for Automated Temporary Immersion (RITA), Temporary Immersion Bioreactors (TIB) and Gravity Immersion Bioreactors (GIB). The experimental design was completely random and means were compared with the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The results showed no significant difference in the number of shoots per explant under different bioreactor systems evaluated, getting 35-40 shoots per explant. However, the highest shoot length was obtained in TIB and GIB systems, with 6 and 8 cm in height, respectively. It is concluded that in contradistinction to RITA and TIB, the GIB system is a viable option for sugar cane commercial micropropagation due to its low cost and easy handling.

**Keywords:** temporary immersion, commercial micropropagation, certified seed.

## INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es la planta más ampliamente cultivada a nivel mundial (FAOSTAT, 2013). Se utiliza principalmente para la producción de azúcar y la generación de insumos para la industria bioenergética y química (Hoarau y otros, 2007; Tew y Cobill 2008). México ocupa el sexto lugar en producción mundial de azúcar de caña, la cual es realizada por 62 ingenios azucareros localizados en 15 de los 32 Estados de la República (CONADESUCA, 2013). Pese a la importancia de este cultivo en el país, actualmente su producción está caracterizada por bajos rendimientos debidos, entre otras causas, a la prácticamente nula renovación de plantaciones por la falta de material vegetativo certificado (Flores, 2001). Como respuesta a esta problemática, la micropropagación o clonación *in vitro* permite la obtención masiva de material vegetal rejuvenecido con alta calidad genética y fitosanitaria bajo condiciones asépticas y controladas. En caña de azúcar se han realizado diversos estudios para su micropropagación (Walker y otros, 1991; Schaufler y Walker, 1995; Wang y otros, 1999; Lakshmanan y otros, 2005; Ming y otros, 2006; Ali y otros, 2008; Sengar, 2011); sin embargo, aun cuando los protocolos son eficientes y reproducibles, los altos costos de producción causados principalmente por la mano de obra y agentes gelificantes de los medios de cultivo, siguen representando un problema para que esta tecnología sea rentable (Cammal y Bello, 2014). Con los avances biotecnológicos se han desarrollado nuevas metodologías para la propagación masiva de plantas *in vitro*, una de ellas son los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), los cuales han demostrado ser una herramienta eficaz para la micropropagación de diferentes especies vegetales de importancia económica como banano (Alvard y otros, 1993; Roels y otros, 2005), café (Berthouly y otros, 2005), fresa (Hanhineva y otros, 2005), papa (Teisson y Aldvard, 1999), piña (Escalona y otros, 1999) e incluso caña de azúcar (Lorenzo y otros, 1998; Mordocco y otros, 2009). Los SIT permiten la automatización en algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard y otros, 1993; Mc Alister y otros, 2005), reduciendo la mano de obra, facilitando el escalado e incrementando la eficiencia biológica y productividad en campo de las especies propagadas (Lorenzo y otros, 1998; Escalona y otros, 1999; Martre y otros, 2001).

El objetivo de este trabajo fue comparar la eficiencia de tres sistemas de biorreactores de inmersión temporal para la micropropagación comercial de caña de azúcar para el establecimiento de semilleros certificados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Instalación del sistema neumático para el funcionamiento de los Sistemas de Inmersión Temporal**

Se utilizó un estante de metal con cuatro repisas, en la parte superior de cada repisa se instalaron mangueras de silicona con salidas para la conexión de los biorreactores. Las mangueras se conectaron a válvulas solenoides y finalmente a un compresor de aire. El funcionamiento del sistema neumático fue regulado por medio de un controlador lógico programable (PLC), el cual encendía las válvulas solenoides para permitir el paso del aire hacia los diferentes biorreactores.

### **Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)**

Los SIT utilizados fueron el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT, Escalona y otros, 1999), el Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA, Alvard y otros, 1995) y el Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG, sistema actualmente implementado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos COLPOS-Córdoba).

### **Material vegetal y condiciones de cultivo**

Para comparar la eficiencia de los tres sistemas, se emplearon brotes de 2cm como explantes de la variedad ITV 92-1424 previamente establecidos *in vitro*. Para la multiplicación de los brotes se utilizó 250 ml de medio de cultivo líquido MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 4.65  $\mu\text{M}$  de cinetina + 3.7  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético + 1.3  $\mu\text{M}$  de benciladenina + 3% de sacarosa (p/v). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.8 y fueron esterilizados en frascos de vidrio de 500 ml en autoclave a 1.5  $\text{Kg cm}^{-2}$  de presión y 121  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Se agregaron 50 ml de medio de cultivo por explante y fueron incubados a  $25\pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ , bajo un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad a una irradiancia de 40-50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El tiempo y frecuencia de inmersión fueron de 2 minutos cada 8 horas.

Los brotes que sobrevivieron fueron trasferidos a fase de enraizamiento que consistió colocar cada brote en medio MS adicionado con 3  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA). Finalmente, las vitroplantas fueron aclimatizadas bajo invernadero bajo condiciones de riego y nebulización.

### **Análisis estadístico**

Se utilizaron cinco explantes por biorreactor y un total de tres biorreactores por cada sistema en un diseño experimental completamente al azar. Después de 25 días de cultivo se contabilizó el número y longitud de brotes. Los datos recopilados fueron procesados utilizando el paquete estadístico SPSS v. 11.5 para Windows. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y comparación de medias de acuerdo a Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Al evaluar los tres SIT en caña de azúcar durante su propagación *in vitro*, no se observaron diferencias estadísticas significativas para el número de brotes por explante; sin embargo, la longitud de los brotes difirió significativamente entre los sistemas de inmersión evaluados. El SIT con mayor número de brotes por explante fue el BIG con 40.55, seguido por el BIT y RITA, con 38.8 y 35.8, respectivamente. La mayor longitud de brotes fue observado en los sistemas BIG y BIT, con 10.7 y 8.6 cm, respectivamente, seguido por el RITA con 6.0 cm de longitud (ver Figura 1 y Tabla I).



Figura 1. Sistemas de Inmersión Temporal. a) Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), b) Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA) y c) Biorreactor de inmersión por gravedad (BIG).

La micropropagación a escala comercial de la mayoría de los cultivos de importancia económica como la caña de azúcar está casi siempre limitada por los altos costos de producción que la tecnología requiere. La semi-automatización de la micropropagación por lo tanto, juega un papel fundamental y la integración de los SIT ofrece una alternativa práctica para reducirlos (Mordocco y otros, 2009). Los SIT evaluados en este trabajo mostraron un buen desempeño en la formación de nuevos brotes si se comparan con la micropropagación convencional de caña de azúcar en medio semisólido obtenidos en otros estudios (Lee, 1987; Lakshmanan y otros, 2001; Cheema y Hussain, 2004; Mamun. y otros, 2004; Ramanand y Lal, 2004; Ming y otros, 2006; Ali y otros, 2008; Sengar, 2011).

Tabla I. Efecto de diferentes Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) sobre el número y longitud de brotes en caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

Tratamiento	Número de brotes/explante	Longitud (cm)
BIT	38.8±0.67 <sup>a</sup>	8.6±0.43a
RITA	35.8±0.58 <sup>a</sup>	6.0±0.27b
BIG	40.0±0.55 <sup>a</sup>	10.7±0.33a

\*Los valores representan la media ± EE (error estándar). Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Lorenzo y otros (1998), reportaron el uso del sistema BIT para la micropropagación de caña de azúcar, obteniendo una mayor cantidad y calidad de plántulas respecto al medio semisólido. Sin embargo, la utilización de este sistema puede resultar compleja ya que requiere la sincronización de dos válvulas solenoides para el movimiento del medio de cultivo. Mordocco y otros en 2009, utilizaron el RITA en la micropropagación de caña de azúcar; sin embargo, la desventaja de este sistema es su capacidad y elevado costo, aunado a ello se requieren pagar gastos de importación, lo que hace poco viable su implementación comercial.

El sistema BIG que actualmente se utiliza en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, tiene entre otras ventajas: bajo costo, capacidad variable, uso de una sola válvula solenoide, permitiendo con ello disminuir los gastos de inversión y electricidad del sistema neumático.

Finalmente, todos los brotes provenientes de estos tratamientos formaron raíces (Figura 2a) y mostraron un 98% de supervivencia durante la etapa de aclimatización (Figura 2 b).

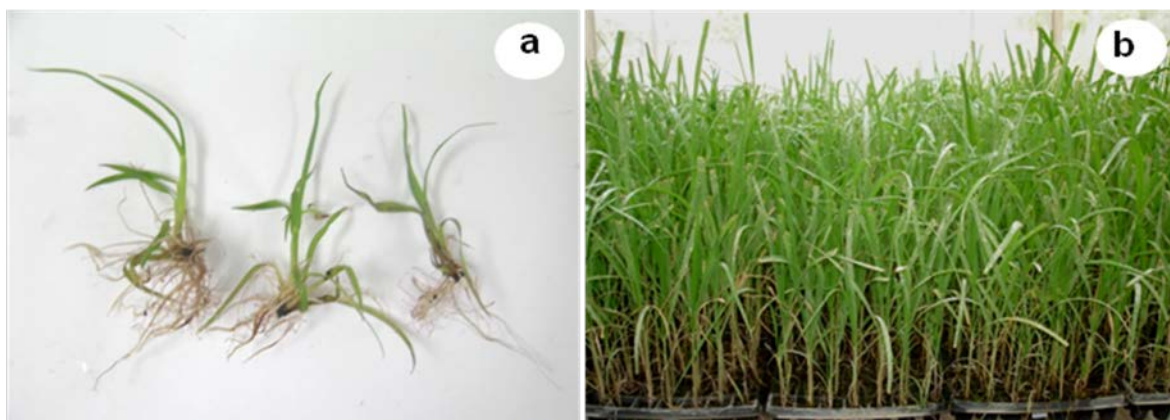


Figura 2. Vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). a) Enraizamiento y b) aclimatización.

### CONCLUSIONES

Considerando a los SIT una alternativa viable para la producción masiva de plántulas de caña de azúcar, los resultados obtenidos en este estudio permiten recomendar al sistema BIG para la implementación de los SIT en la micropropagación comercial de caña de azúcar, lo anterior, debido al bajo costo de implementación y fácil manejo.

### REFERENCIAS

- Ali, A; Naz, S; Siddique, F A; Iqbal, J (2008). Rapid clonal multiplication of sugarcane through callogenesis and organogenesis. *Pak J Bot.* 40(1), 123-138.
- Alvard, D; Côte, F; Teisson, C (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 32, 55-60.

Berthouly, M; Etienne, H (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In Liquid culture systems for in vitro plant propagation. Springer, Netherlands, pp. 165-195.

Caamal-Velázquez, H; Bello-Bello, J (2014). Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Colegio de Postgraduados, Estado de México, México, pp 5-7.

Cheema, K L; Hussain, M A (2004). Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud. *Int J Agri Biol.* 6, 257-259.

CONADESUCA (2013). Sistema infocaña. Reportes de cierre. <http://azfc/reportes/reportes.php?tipo=CIERRE> (Consultado enero 2014).

Escalona, M; Lorenzo, J C; González, B; Daquinta, M; González, J L; Desjardins, Y; Borroto, C G (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18(9), 743-748.

FAOSTAT (2013). Sugarcane production. Food and agriculture organization. Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/site/399/default.aspx> (Consultado octubre 2013).

Flores, C S (2007). Las variedades de caña de azúcar en México. ATAM, México. 238p.

Hanhineva, K; Kokko, H; Kärenlampi, S (2005). Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In vitro Cell Dev-Plant.* 41(6), 826-831.

Hoarau, J Y; Souza, G; D'Hont, A; Menossi, M; Rossini-Pinto, L; Pereira de Souza, A; Grivet, L; Martins-Menck, C F; Cesar-Ulian, E; Vincentz, M (2007). Sugarcane, a tropical crop with a highly complex genome (Morot-Gaudry, J F; Lea, P; Briat, J F eds). *Functional plant genomics*. Enfield Science Publishers, Enfield, pp 481-499.

Lakshmanan, P; Geijskes, R J; Aitken, K S; Grof, C P; Bonnett, G D; Smith, G R (2005). Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In vitro Cell Dev-Pl.* 41, 345-363.

Lakshmanan, P; Geijskes, R J; Elliott, A R; Nutt, K; Berding, N; Grof, C P; Smith, G R (2001). Plant regeneration. PCT Patent Application WO 01/82684.

Lal, M (2004). An efficient protocol for in vitro micropropagation of sugarcane. *Sugar Tech.* 6(1-2), 85-87.

Lee, T S G (1987). Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant Cell Tiss Org Cult.* 10(1), 47-55.

Lorenzo, J C; González, B L; Escalona, M; Teisson, C; Borroto, C (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 54(3), 197-200.

Mamun, M A; Sikdar, M B H; Paul, D K.; Rahman, M M; Islam, M R (2004). In vitro micropropagation of some important sugarcane varieties of Bangladesh. *Asian J Plant Sci.* 3(6), 666-669.

Martre, P; Lacan, D; Just, D; Teisson, C (2001). Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 67, 25-35.

Mc Alister, B; Finnie, J; Watt, M P; Blakeway, F (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA<sup>®</sup>) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 81, 347-358.

Ming, R; Moore, P H; Woo, K K; Hont, A; Glaszmann, J C; Tew, T L; Mirkov, T E; Silva, J D; Jifon, J; Rai, M; Schnell, R J; Brumbley, S M; Lakshmanan, P; Comstock, J C; Paterson, A H (2006). Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. *Plant Breeding Rep.* 27, 17-117.

Mordocco, A M; Brumbley, J A; Lakshmanan, P (2009). Development of a temporary immersion system (RITA<sup>®</sup>) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In vitro Cell Dev-Pl.* 45(4), 450-457.

Murashige, T; Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 67, 603-607.

Roels, S; Escalona, M; Cejas, I; Noceda, C; Rodriguez, R; Canal, M J; Debergh, P (2005). Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 82(1), 57-66.

Schaufler, D H; Walker, P N (1995). Micropropagation of sugarcane between parallel plates. *T Am Soc Agr Eng.* 37, 1225-1230.

Sengar, K.; Sengar, R S; Kumar, G S (2011). The effect of *in vitro* environmental conditions on some sugarcane varieties for micropropagation. *Afr J Biotechnol.* 10(75), 17122-17126.

Teisson, C; Alvard, D (1999). *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Res.* 42(3-4), 499-504.

Tew, T L; Cobill, R M (2008). Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum spp.*) as an energy crop (Vermerris W ed. Genetic improvement of bioenergy crops). Springer, New York, pp 249-294.

Walker, P N; Harris, J P; Gautz, L D (1991). Optimal environment for sugarcane micropropagation. *T Am Soc Agr Eng.* 34, 2609-2614.

Wang, Z; Heinemann, P H; Walker, P N; Heuser, C (1999). Automated micropropagated sugarcane shoot separation by machine vision. *T Am Soc Agr Eng.* 42, 247-254.