

# PROYECTO PILOTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR POR CULTIVO DE TEJIDOS

## PILOT PROJECT TO PRODUCE SUGARCANE SEEDLINGS THROUGH TISSUE CULTURE

Bello-Bello Jericó Jabín\*, Flores-Revilla Carlos, Rangel-Ortega Aarón

Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar A.C. Calle Rio Niágara Número 11, Interior 1, Delegación Cuauhtemoc, Distrito Federal, México CP. 06500.

\*E-mail: [jericobello@gmail.com](mailto:jericobello@gmail.com)

### Resumen

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los más importantes en la economía de México. Sin embargo, su producción está caracterizada por su bajo rendimiento en campo debido, entre otras causas, a la prácticamente nula renovación de plantaciones por la falta de material vegetativo certificado. Como respuesta a esta problemática, la micropropagación o clonación *in vitro* surge como una poderosa herramienta de la biotecnología vegetal para la obtención de plantas certificadas: planta libre de patógenos, genéticamente homogénea y vigorizada bajo condiciones de laboratorio. El presente proyecto se llevará a cabo en cuatro líneas de trabajo: 1. Saneamiento por medio de cultivo de tejidos *in vitro* del banco de germoplasma de la Estación de Hibridación (E.H) 2. Establecimiento del banco de cruzamientos con plántulas *in vitro* de la E.H. 3. Transferencia de conocimiento generado a los técnicos de los Campos Experimentales Regionales (CER`s) y 4. Multiplicación de variedades que los CER`s, Comité de Calidad y Producción Cañera (CCPC) y productores soliciten al Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA). El objetivo del proyecto es establecer una planta piloto para la producción de plantas de caña de azúcar utilizando técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, sanear por medio de cultivo de tejidos *in vitro* el banco de germoplasma de la Estación de Hibridación (E.H), establecer el banco de cruzamientos con plántulas *in vitro* de la E.H., transferir conocimiento generado a los técnicos de CER`s y propagar variedades que los CER`s, CCPC y productores lo soliciten al CIDCA.

**Palabras clave:** Micropropagación, cultivo *in vitro*, *Saccharum* spp.

## Abstract

Sugarcane (*Saccharum* spp.) culture is one of the most important in the economy of Mexico. However, their production is characterized by low yield in field because, among other causes, the lack of certified planting material. In response to this problem, micropropagation or *in vitro* cloning emerges as a tool of plant biotechnology for the production of certified plants: free of pathogens, genetically homogeneous and invigorated plant under laboratory conditions. This project will be carried out in four lines: 1. Sanitation of the germplasm from the Hybridization Station (E.H.) using *in vitro* tissue culture techniques, 2. Establishment of the Crossings Bank from the E.H. with *in vitro* seedlings, 3. Transference of generated knowledge to technicians from the Regionals Experimental Fields (CER's) and 4. Multiplication of varieties than CER's, Comité de Calidad y Producción Cañera (CCPC) and producers request to Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA). The objective of the project is to establish a pilot plant for the production of sugarcane plants using Plant Tissue Culture techniques, sanitize through *in vitro* tissue culture the germplasm from the E.H., establish the Crossings Bank from the E.H. with *in vitro* seedlings, transfer generated knowledge to technicians from the CER's and propagate varieties that CER's, CCPC and producers request to CIDCA.

**Key words:** Micropropagation, *in vitro* culture, *Saccharum* spp.

## INTRODUCCIÓN

En México, la mayor parte de las variedades comerciales de caña de azúcar se propagan por métodos convencionales mediante la siembra de yemas; sin embargo, esta técnica no garantiza el saneamiento y rejuvenecimiento de las variedades seleccionadas en campo. Esto provoca pérdidas de la capacidad de regeneración, que se ve reflejado en los bajos rendimientos en campo. De acuerdo a Flores (2001), las variedades de caña se deterioran con el transcurso de los años, perdiendo su poder productivo, el cual pueden llegar a deteriorarse y finalmente desaparecer del cultivo comercial.

Una de las alternativas más utilizada para el saneamiento y rejuvenecimiento de esta especie es mediante el uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV). Esta herramienta biotecnológica resulta de gran utilidad para la conservación y micropropagación del material vegetal en espacios pequeños bajo condiciones asépticas y controladas. Mediante estas técnicas de cultivo se puede tener un suministro de material de manera constante y homogénea, esto no sucede en la propagación vegetativa por yemas, que es de naturaleza estacional. De acuerdo a Pérez *et al.*, (2000), como resultado del efecto combinado del saneamiento y el rejuvenecimiento *in vitro* se demostró experimentalmente que se incrementaron los rendimientos en azúcar por área entre el 10 al 15%.

Por otro lado, el programa de intercambio de variedades que desarrolla CIDCA con otros países se encuentra limitado debido a la retención de material vegetal en aduana y el largo periodo que este debe permanecer en la estación cuarentenaria. Ante esta situación, el traslado de plantas bajo condiciones *in vitro* constituye una opción viable y oportuna para agilizar el intercambio de variedades con otros países.

El objetivo de este proyecto es establecer una planta piloto para la producción de plantas de caña de azúcar utilizando técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), sanear por medio de cultivo de tejidos *in vitro* el banco de germoplasma de la Estación de Hibridación (E.H), establecer el banco de cruzamientos con plántulas *in vitro* de la E.H., transferir conocimiento generado a los técnicos de CER`s y multiplicar variedades que los CER`s, CCPC y/o productores que lo soliciten al CIDCA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Localización geográfica del proyecto***

Las plántulas de caña de azúcar se propagarán en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales ubicado CIDCA con dirección en la carretera Tapachula-Talismán en el kilómetro 17.5, Tuxtla Chico, C.P. 30870, Estado de Chiapas, México. Coordenadas geográficas 14°57'05.87"N – 92°09'14.60"O.

### ***Diseño, adecuaciones y equipamiento de la planta piloto***

El diseño y construcción de la planta piloto cuenta con adecuaciones como el uso de la luz natural a fin de ahorrar costos y mejorar el proceso de aclimatación de las vitroplántulas. Para lograrlo se implementaron paneles traslúcidos y paredes con doble cristal, lo que permite el mejor aprovechamiento de la luz solar y el ambiente térmico. Estas instalaciones son aptas para la producción de vitroplantas a bajo costo. El tiempo aproximado de ejecución para el establecimiento de estas instalaciones fue de 3 meses. Terminadas las instalaciones, se procedió a la compra de equipos y reactivos de laboratorio.

### ***Saneamiento por medio de cultivo de tejidos in vitro***

Fase 0. *Selección de plantas madre.* En esta etapa se tomaron muestras de ápices para su posterior establecimiento *in vitro* a partir del banco de germoplasma del CIDCA.

Fase 1. *Establecimiento de los cultivos asépticos.* El material vegetal obtenido en campo se sometió a un lavado con jabón (Tween 20), luego se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar residuos del jabón. Posteriormente se realizaron cortes de 20 cm de longitud; seguidamente se llevó a cabo un tratamiento de hidrotermoterapia a 50°C durante 10 min., seguido de una inmersión en etanol al 70% durante 1 minuto. Una vez desinfectado el material vegetal se procedió al establecimiento de ápices. Para inducir la formación de brotes se empleó el medio (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con kinetina (KIN: 4.6 µM), 3% de sacarosa y como agente gelificante del medio se agregó Gelrite™ al 0.22% (w/v). El pH fue ajustado a  $5.7 \pm 0.1$  y los medios fueron esterilizados en autoclave a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Una vez colocados los explantes en el medio de cultivo fueron incubados a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con fotoperiodo (16 hora luz) a una irradiancia de 40-50 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Después 1 mes en medio de inducción, los explantes son transferidos a medio de multiplicación.

Fase 2. *Multiplificación.* En esta etapa se realizó la micropropagación masiva de plantas, que consiste en inducir la formación de un gran número de nuevos brotes a partir de brotes obtenidos *in vitro*. Para este fin se llevaron a cabo de hasta 7 subcultivos empleando el medio MS + KIN (4.65 µM) + ácido indolacético (AIA: 3.7 µM) + benciladenina (BAP: 1.3 µM) bajo las mismas condiciones empleadas en la etapa de establecimiento, una vez que los brotes fueron formados se transfirieron a medio de elongación y enraizamiento.

Fase 3. *Elongación y enraizamiento.* Los brotes obtenidos formaron su sistema radical y al mismo tiempo incrementaron su tamaño para facilitar su manipulación y adaptación a las condiciones ambientales externas. En esta etapa se emplearon como reguladores del crecimiento auxinas y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en medio MS.

### ***Aclimatización en invernadero de las variedades seleccionadas de la E.H.***

El proceso de adaptación al medio externo (aclimatización) deberá ser gradual, por lo cual las vitroplántulas obtenidas se sometieron a una reducción lenta de la humedad relativa (del 90% al 50%), así como a un incremento paulatino de la intensidad luminosa (de 40-50 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> a 120 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). La infraestructura de invernadero garantizó el control tanto de la humedad relativa como de la entrada de luz. Antes de iniciar esta fase, se llevó a cabo la construcción del invernadero para aclimatización de vitroplantas.

### ***Transferencia de conocimiento***

En esta fase del proyecto se realizó una mesa de trabajo para la transferencia de conocimiento generado a los técnicos de los CER's.

### ***Multiplicación de variedades que los CER's, CCPC y/o productores lo soliciten al CIDCA***

Una vez establecidos los sistemas de micropropagación en medio semisólido, se implementaron 30 sistemas de inmersión temporal (SIT) en medio líquido. Para ello se empleó la metodología propuesta por Lorenzo *et al.* (1998; 2001) para caña de azúcar. En esta metodología se consideró 2 min de tiempo de inmersión cada 8 horas. Los biorreactores tuvieron una capacidad de 4 L. Las condiciones de incubación serán las mismas que fueron empleadas en las fases anteriores.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Establecimiento de la planta piloto**

En la Figura 1 se muestra el diseño y construcción de la planta piloto con paneles translúcidos y paredes con doble cristal, lo que permite el mejor aprovechamiento de la luz solar y el ambiente térmico.



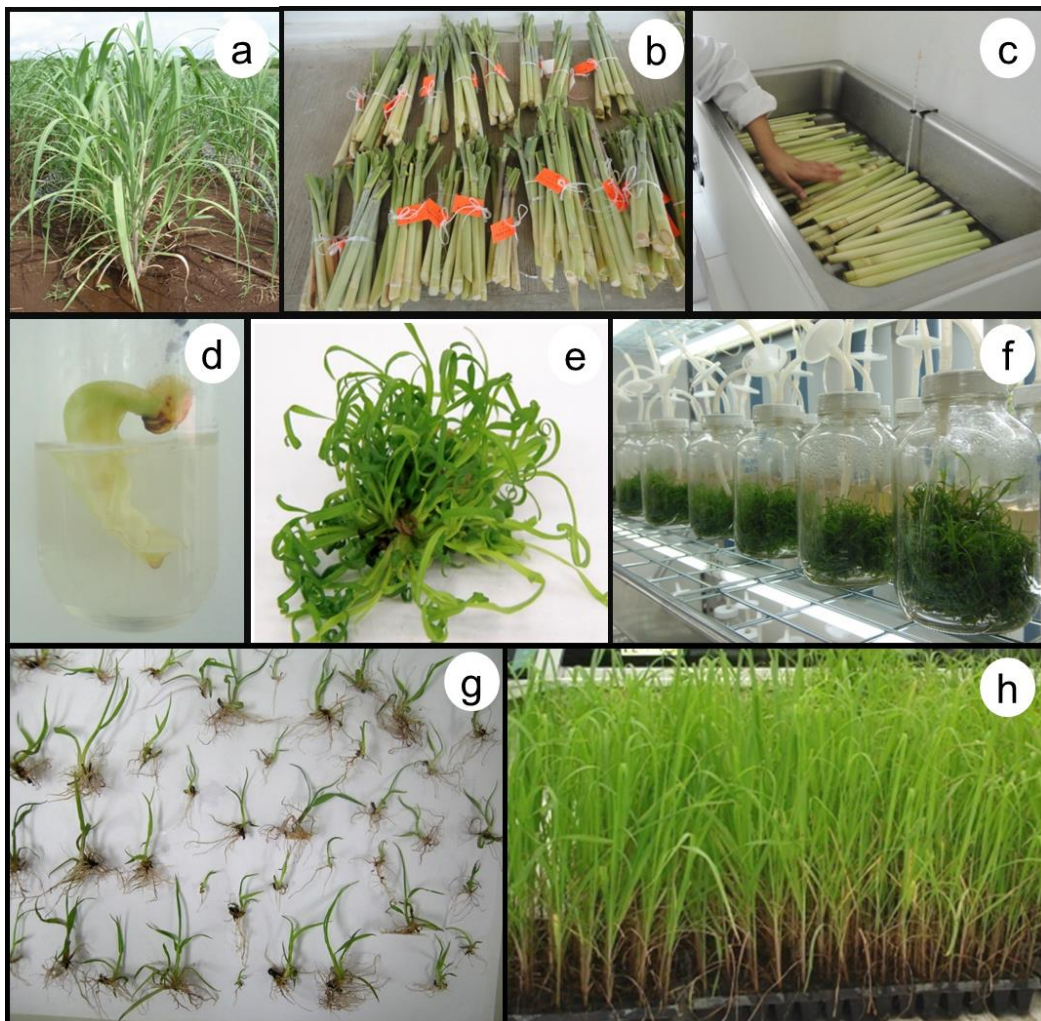
**Figura 1.** Diseño de la planta piloto con luz natural.

### **Producción de plántulas de caña de azúcar por cultivo de tejidos**

Se seleccionaron 368 variedades del banco de cruzamiento de CIDCA. En estas variedades se llevaron a cabo todas las fases de la micropropagación: Etapa 0. Selección y pretratamiento de plantas madre. Etapa 1. Establecimiento de los cultivos asépticos. Etapa 2. Multiplicación. Etapa 3. Elongación y enraizamiento y Etapa 4. Aclimatización (ver Figura 2). Las vitroplantas fueron llevadas a campo para el establecimiento del banco de cruzamientos. Para este fin, se utilizaron vitroplantas con las siguientes características:

- Sanidad vegetal: libres de plagas y enfermedades.
- Alta pureza varietal: no haber más de una variedad dentro del semillero.
- Homogeneidad genética: sin presencia de variantes somaclonales (mutaciones).

El banco de cruzamientos fue utilizado para continuar con el programa de obtención de variedades de caña de azúcar a cargo de CIDCA.



**Figura 2.** Micropropagación de caña de azúcar. a) Etapa 1: selección de planta madre, b) material vegetal seleccionado, c) termohidroterapia, d) ápice de caña de azúcar en la etapa 1: establecimiento *in vitro*, e) etapa 2: multiplicación de los explantes, f) multiplicación en biorreactores de inmersión temporal, g) etapa 3: elongación y enraizamiento y h) Etapa 4: aclimatización de caña de azúcar.

### **Transferencia de conocimiento**

Se realizó una mesa de trabajo del 3-4 de julio para la transferencia de conocimiento generado a los técnicos de los CER's. En la Figura 3 se muestra los integrantes de los 11 CER's y personal de CIDCA.



**Figura 3.** Fotografía panorámica de la mesa de trabajo entre representantes de los 11 CER's y personal de CIDCA.

### **CONCLUSIONES**

Este proyecto permitió la obtención de plantas certificadas: planta libre de patógenos, genéticamente homogénea y vigorizada bajo condiciones de laboratorio. Estas plantas fueron utilizadas para el establecimiento del banco de cruzamientos del CIDCA y continuar con el programa de mejoramiento genético mediante la obtención de nuevas variedades de caña de azúcar.

### **AGRADECIMIENTOS**

Al Comité Técnico Administrativo del CIDCA, A. C. por su apoyo en la realización de este proyecto y al Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (CONADESUCA) por el financiamiento otorgado.

### **REFERENCIAS**

- Flores S.C. (2001). Las variedades de Caña de Azúcar en México. pp. 226-228.
- Lorenzo J.C, Ojeda E, Espinosa A, y Borroto C. (2001). Field Performance of Temporary Immersion Bioreactor-Derived sugarcane plants. *In vitro Cell Dev. Biol.* 37: 803-806.
- Lorenzo J.C., Gonzalez B.L, Escalona M., Teisson C., Espinosa P., y Borroto C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 54:197-200.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Pérez P.J.N., Suárez C. M. y Orellana P.P. (2000). Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Biotecnología Vegetal.* 1: 3-12.