



Revista Industrial
y Agrícola de
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea
1851-3018

Tomo 101 (1):
13-22; 2024



ESTACION EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150
T4101XAC - Las Talitas.
Tucumán, Argentina.

Alternativas para incrementar la eficiencia de establecimiento *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

Aydiloide Bernal Villegas, Edel Alejandro Toledo Rodríguez, Yisel Molina Hernández, Mirelys Alejo Sierra, Ada Teresa Aguiar Fernández, Jersy Álvarez Ferreiro, Rafael Gómez-Kosky.

Aydiloide Bernal Villegas <https://0000-00017976-1993/>

Edel Alejandro Toledo Rodríguez¹ <https://0000-0002-0522-7330/>

Rafael Gómez Kosky¹ <https://0000-0003-3656-9824/>

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA Villa Clara). Autopista Nacional km 246, Ranchuelo Villa Clara, Cuba. CP: 53100 E-mail: aydiloide.bernal@inicavc.azcuba.cu

ABSTRACT

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar alternativas para incrementar la eficiencia de la fase de establecimiento *in vitro* en el proceso de micropropagación de caña de azúcar. Para ello se estudió el empleo como explante de discos de hojas inmaduras de caña de azúcar. Se analizaron dos procedencias del material donante (proveniente de bancos establecidos en campo y de bancos mantenidos bajo condiciones semicontroladas), así como diferentes medios de cultivo. Se estudió, también, el efecto de la posición de los discos de hojas en el medio de cultivo (vertical u horizontal) y de la posición de los discos en el cilindro de hojas sobre la regeneración de plantas *in vitro*. El cultivar utilizado fue C97-445. Se usó material vegetal de ambos bancos de donantes con el empleo como explantes iniciales de ápices caulinares y discos de hojas. Los resultados indican que utilizar discos de hojas obtenidos de plantas madre procedentes de Bancos de Donantes en condiciones semicontroladas permite lograr bajos índices de oxidación fenólica y contaminación microbiana y mayor cantidad de brotes. La mejor combinación de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo fue de 0,5 mg l⁻¹ de kinetina y 5,0 mg l⁻¹ de ANA y se demostró que el segmento 4 fue el de mayor número de plantas por disco, y que unido con los segmentos 2 y 3 permitió obtener un total de 55 plantas por cilindro para el cultivar de caña de azúcar C97-445 a los 30 días de cultivo.

Key words: brotes *in vitro*, caña de azúcar, condiciones de cultivo, disco de hojas.

RESUMEN

Alternatives to increase the *in vitro* establishment efficiency of sugarcane (*Saccharum* spp.).

The objective of this work was to analyze alternatives to increase the efficiency of the *in vitro* establishment phase in the sugarcane micropropagation process. For this purpose, the use of immature sugarcane leaf discs as explants was studied. Two sources of donor material were analyzed (from banks established in the field and from banks maintained under semi-controlled conditions), as well as different culture media. The effect of the position of the leaf discs in the culture medium (vertical or horizontal) and the position of the discs in the leaf cylinder on the regeneration of plants *in vitro* was also studied. The cultivar used was C97-445. Plant material from both donor banks was used with the use of root apices and leaf discs as initial explants. The results achieved indicate that using leaf discs obtained from mother plants from Donor Banks under semi-controlled conditions allows achieving low rates of phenolic oxidation and microbial contamination and a greater number of sprouts. The best combination of growth regulators in the culture medium was 0,5 mg l⁻¹ of kinetin and 5,0 mg l⁻¹ of ANA and it was shown that segment 4 had the highest number of plants per disc. Together with segments 2 and 3, it allowed us to obtain a total of 55 plants per cylinder for the sugar cane cultivar C97-445 after 30 days of cultivation.

Palabras clave: culture conditions, *in vitro* shoots, leaf disk, sugarcane.

Fecha de
recepción:
28/07/2023

Fecha de
aceptación:
15/04/2024

■ INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. Está distribuido en 100 países sobre un área de 26 millones de hectáreas de tierras cultivadas, fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales, por lo que ocupa el lugar 12 de un total de 161 especies de interés agroindustrial (Portal Caña, 2022).

En Cuba, la caña de azúcar se encuentra distribuida a través de todo el territorio nacional en un área de 416.752,9 ha plantadas. Según el censo anual del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), se encuentran implantados 82 cultivares, 69 de ellos son cubanos y 13 introducidos (Jorge *et al.*, 2022).

La combinación de métodos de propagación convencional con modernas técnicas de propagación *in vitro* constituye una de las estrategias que se emplean en Cuba para obtener la cantidad de “caña semilla” necesaria para satisfacer la demanda de los productores. Perfeccionar el proceso productivo en el laboratorio y su escalado es primordial, para lo cual se hace necesaria la integración de las diferentes fases de la propagación *in vitro* (Thorpe, 2014).

La biotecnología en este cultivo constituye una herramienta importante para el mejoramiento genético y la propagación masiva. Existen dos vías de regeneración de plantas *in vitro*: la organogénesis y la embriogénesis somática (Pérez, 1998). La primera permite obtener, en corto tiempo, gran número de individuos idénticos a la planta original, por lo que resulta indispensable iniciar la propagación con plantas madre o donadoras de tejidos libres de microorganismos patógenos.

Los mayores problemas durante la fase de establecimiento *in vitro* son la contaminación bacteriana y fúngica, presente en la superficie de las hojas y segmentos nodales, así como la oxidación fenólica (North *et al.*, 2012). Esto hace el proceso ineficiente e ineficaz biológica y económicamente; por lo cual se vuelve necesario realizar cambios en la fase para incrementar la eficiencia.

El establecimiento *in vitro* con material procedente del Banco de Donantes en condiciones semicontroladas reduce las pérdidas por contaminación microbiana (Díaz *et al.*, 2020). El empleo de un nuevo método de establecimiento *in vitro* con la regeneración de plantas de forma directa a partir de discos de hojas inmaduras sin formación de callos permitirá la obtención de mayor número de brotes y la disminución del requerimiento de material de partida (Bernal *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar diferentes variables para incrementar la eficiencia en el establecimiento *in vitro* utilizando como explante discos de hojas inmaduras de caña de azúcar.

■ MATERIALES AND MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en la Complejo Científico Productivo de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA VC), perteneciente al Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), en el municipio de Ranchuelo, provincia Villa Clara, Cuba.

El material vegetal utilizado fue la porción apical

de tallos jóvenes del cultivar C97-445 de caña de azúcar. A los cuatro meses de cultivo de los tallos en condiciones semicontroladas, y suspendido el riego por tres días, se tomó la parte apical (cogollos) con el auxilio de un cuchillo desinfectado previamente con etanol al 70%. El material vegetal fue rápidamente sumergido en agua desmineralizada dentro de un frasco plástico y llevado al laboratorio (Biofábrica), donde se comenzó el proceso de desinfección (Bernal *et al.*, 2021).

En el laboratorio, a partir de los cogollos, se obtuvieron cilindros de hojas jóvenes de aproximadamente 10,0 a 15,0 cm de longitud y 1,0 cm de diámetro. Después, fueron lavados con detergente doméstico (3 a 5 ml por cada 250 ml de agua) y luego se enjuagó con agua para eliminar el detergente. La primera desinfección se realizó sumergiendo los cilindros, durante un minuto, en recipientes estériles que contenían una solución de etanol al 70%.

En la cabina de flujo laminar se enjuagó el material para eliminar el etanol y luego se lo sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 3,0% (v/v) durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua desmineralizada estéril y se colocó el material en un frasco de cultivo estéril con una solución de 100 mg l⁻¹ de ácido ascórbico.

A continuación, se procedió a la reducción del tamaño de los cilindros hasta 0,5 cm de diámetro y 5,0 cm de longitud. Este fue el explante inicial que se empleó durante el establecimiento *in vitro* de la caña de azúcar.

Los medios, frascos y tubos de cultivos utilizados en este trabajo fueron esterilizados en autoclave vertical a 121°C y 1,2 kg cm⁻² de presión. Los platos metálicos para el trabajo en la cabina de flujo laminar fueron esterilizados en la estufa a 180°C durante 2 h. El instrumental (pinzas y bisturíes) fue desinfectado en un esterilizador eléctrico modelo DENT-EQ (Alemania) que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar horizontal, donde se realizó el manejo del material vegetal en condiciones de esterilidad. Las condiciones de cultivo *in vitro* para todos los experimentos fueron las descritas por Bernal *et al.* (2021).

■ Ensayo 1. Efecto del empleo de plantas madre de dos procedencias (Banco de Donantes en condiciones semicontroladas y en campo) y diferentes medios de cultivo en el establecimiento *in vitro*

El objetivo de este experimento fue comparar el establecimiento *in vitro* usando plantas madre desarrolladas en condiciones semicontroladas (Banco de Donantes semicontrolado) y material vegetal proveniente directamente del campo (Banco de Donantes en campo), según la metodología establecida por Jiménez *et al.* (1997). Se utilizó como material vegetal inicial 10 cilindros de hojas de caña de azúcar de aproximadamente 10 cm de longitud por tratamiento.

Los discos de hojas fueron colocados de forma vertical en dos medios de cultivo (M1 y M2), en tubos de cultivo de vidrio de un tamaño de 16 x 2 cm, con 10 ml de medio de cultivo semisólido. El medio de cultivo basal fue el compuesto por las sales Murashige and Skoog (1962) (MS) al 100%, vitaminas Heinz and Mee (1969), 30 g l⁻¹ de sacarosa y gelificado con 7,0 g l⁻¹ de agar E (BIOCEN, Cuba). Los reguladores del crecimiento empleados fueron la kine-

tina (Kin) y el ácido naftalen acético (ANA) en sustitución de la 6- bencilaminopurina (6 BAP). Los tratamientos fueron: a) medio basal con Kin 0,5 mg l⁻¹ + ANA 5,0 mg l⁻¹ (M1) y b) medio basal con Kin 1,0 mg l⁻¹ + ANA 5,0 mg l⁻¹ (M2), según lo referido por Kaur and Sandhu (2015) en combinación con las dos condiciones de procedencia de las plantas madre.

Como control se emplearon ápices caulinares obtenidos de los cilindros, lo cuales se colocaron en medio de cultivo de establecimiento con 6 BAP según Jiménez *et al.* (1997). El pH se ajustó a 5,8 con NaOH (1,0 N) y HCl (1,0 N), previo a la esterilización mediante ebullición a 100°C durante 4 min.

En todos los tratamientos se evaluaron las siguientes variables: 1) número de discos de hojas contaminados (bacterias y/o hongos) y con oxidación fenólica o amarronamiento. Esta evaluación se realizó a los 15 días de cultivo y los datos fueron convertidos a porcentajes. 2) número de brotes por discos, número de brotes con raíces y número total de brotes por cilindro. Esta evaluación se realizó a los 30 días de cultivo.

Ensayo 2. Efecto de la posición del explante en el medio de cultivo y de la posición del disco de hojas en el cilindro en la regeneración de plántulas *in vitro*

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la posición del disco de hoja en el cilindro y de la posición del explante en el medio de cultivo (vertical u horizontal) en la obtención de plantas *in vitro*. Para esto se dividió el cilindro en cinco segmentos de 0,5 cm de diámetro y 1,0 cm de longitud. Se tomó como primer segmento la parte basal del cilindro (Figura 1) y a partir de este se numeraron cuatro más.

Los discos de hojas fueron colocados en frascos plásticos transparente Magenta® en posición vertical y

horizontal (Figura 2).

Se emplearon 70 discos de hojas de caña de azúcar por cada tratamiento. A los 15 días de cultivo se evaluó el número de discos de hojas contaminados (bacterias y hongos) y con oxidación fenólica o amarronamiento. A los 30 días se evaluó el número de brotes por disco, número de brotes con raíces, altura (cm) y número de hojas de las plantas *in vitro*.

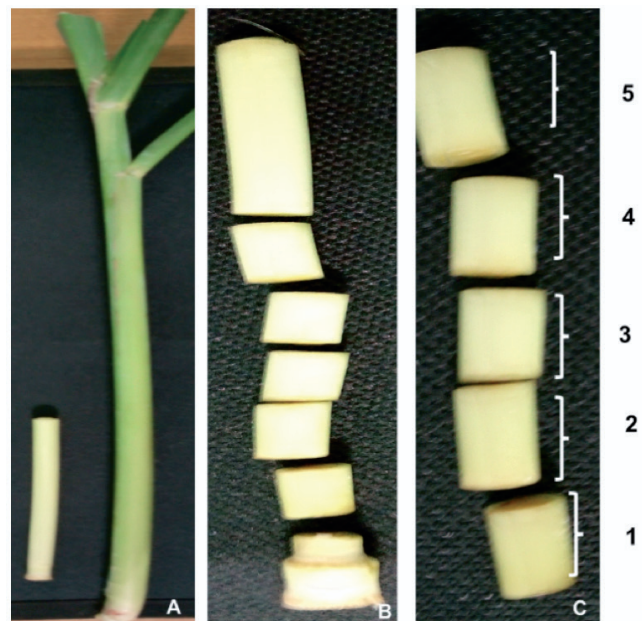


Figura 1. Material vegetal de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) del cultivar C97-445 empleados en la obtención de discos de hojas, (A) ápice caulinar y cilindro de hojas inmaduras, (B) secciones del cilindro de hojas para la obtención de los discos y (C) numeración de los discos.

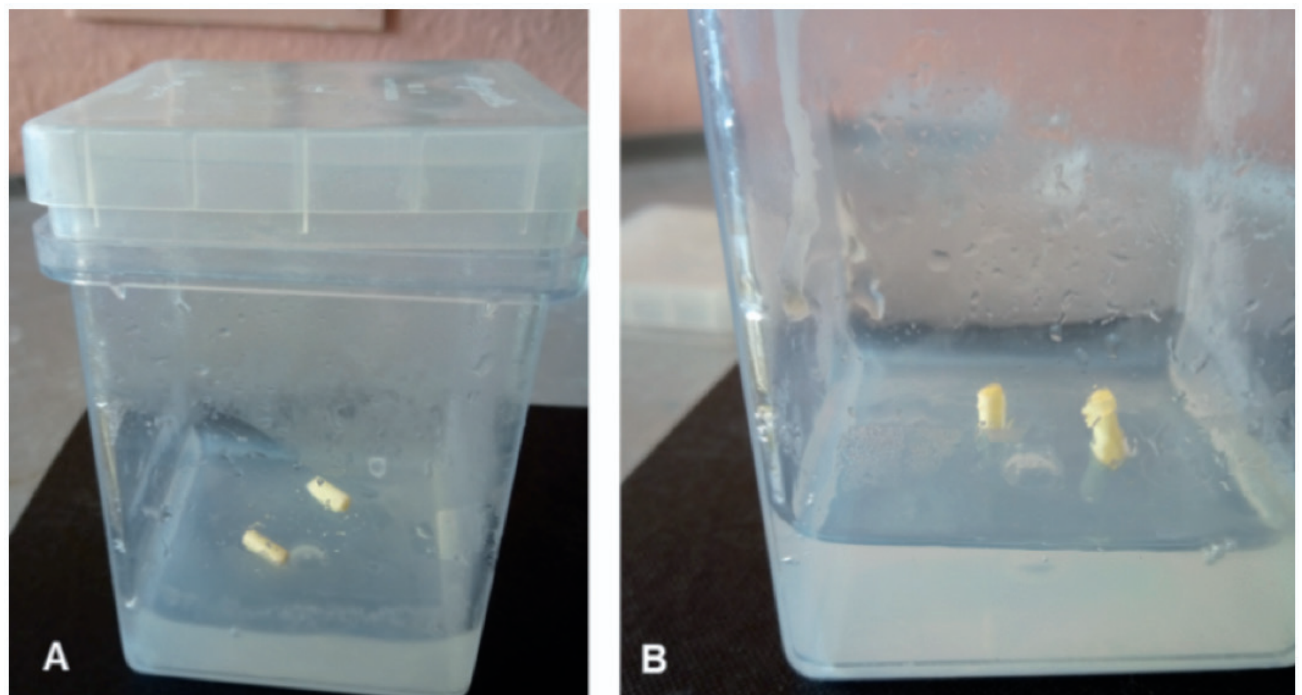


Figura 2. Discos del cultivar de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-445) colocados en el medio de cultivo en posición horizontal (A) y vertical (B).

Análisis estadístico

Los datos originales fueron comprobados para su ajuste a la normalidad mediante prueba de Bartlett-test, con su correspondiente Chi cuadrado. El paquete estadístico utilizado fue STATISTICA sobre Windows versión 8.0 del 2007. Para la evaluación estadística de los resultados se utilizó un ANOVA bifactorial de efecto fijo para la posición del disco en los dos experimentos evaluados. La comparación de medias se realizó mediante la prueba múltiple de rango de Tukey ($p \leq 0.05$). Todos los experimentos fueron repetidos dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1

Los resultados de este ensayo demostraron la importancia de las condiciones de cultivo del material donante del explante. Así, los discos de hojas procedentes del Banco de Donantes en condiciones semicontroladas tuvieron, en los dos medios de cultivo utilizados, una respuesta significativamente superior para las variables oxidación fenólica, presencia de contaminación por microorganismos y supervivencia de explantes con respecto al tratamiento en el que se utilizaron ápices provenientes del Banco de Donantes en campo (Tabla 1, Figuras 3 y 4). No se observaron diferencias entre los medios de cultivo ensayados.

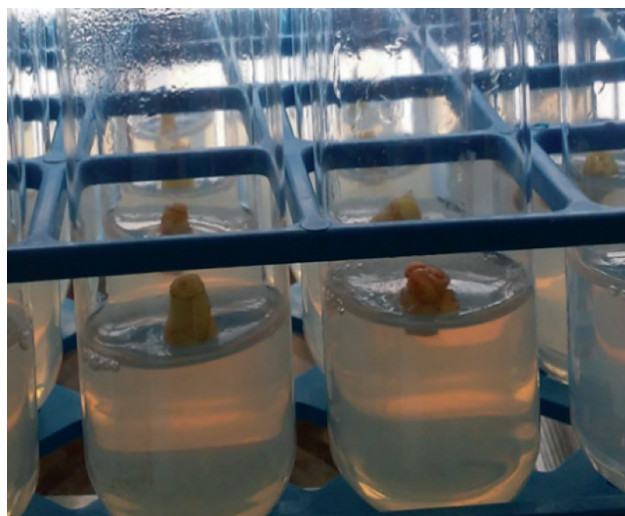


Figura 3. Disco de hojas jóvenes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-445) proveniente del material vegetal cultivado en el Banco de Donantes semicontrolado, a los tres días de colocados en medio de cultivo.



Figura 4. Disco de hojas jóvenes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-445) a los 20 días de colocados en medio de cultivo (A) Material vegetal proveniente del Banco de Donantes en condiciones semicontroladas (B) Material vegetal tomado del Banco de Donantes en campo.

Tabla 1. Efecto de la procedencia del material vegetal y el medio de cultivo sobre el establecimiento *in vitro* a partir de discos de hojas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-445) a los 15 días de cultivo.

Procedencia del material vegetal	Kinetina (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	Oxidación explante (%)	Contaminación (%)			Muertos (%)	Vivos (%)
				Bacterias	Hongos	Total		
Banco de Donante semicontrolado	0,5	5,0	0,0 a	0,0	0,0	0,0 a	0,0 b	100 a
Banco de Donante semicontrolado	1,0	5,0	0, a	1,6	0,0	1,60 a	0,0 b	100 a
Banco de Donante en Campo*	6 0,3 mg L ⁻¹		52,5 c	24,8	7,5	32,4 b	20,0 a	80,0 b

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la Prueba de proporciones (*) Control (n=50).

Para el caso del durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch.) cultivar 'Salcajá', las pruebas demostraron que explantes provenientes de material joven fueron menos susceptibles a oxidarse en comparación con los de mayor tiempo de formación, los cuales se vieron altamente afectados por las heridas ocasionadas al tejido y con ello se favoreció la oxidación (Cabrera, 2003). Esto es debido a que al herir o romper los tejidos se estimula la respiración; además, el material vegetal de mayor edad se encuentra altamente lignificado y al momento de realizar los cortes, estos se vuelven más difíciles; de este modo se ocasionan heridas innecesarias como rasgaduras del tejido en el explante.

En diferentes trabajos se señala el empleo de sustancias antioxidantes durante el proceso de desinfección y en el medio de cultivo. Fueron empleados ácido ascórbico, ácido cítrico, carbón activado y polivinilpirrolidona (PVP) (Franklin *et al.*, 2006; Lakshmanan *et al.*, 2006; Sandhu *et al.*, 2016; Ramasamy *et al.*, 2018).

Según lo informado por North *et al.* (2012), los tejidos meristemáticos jóvenes contienen altos niveles de fenoles que son liberados al medio de cultivo durante el establecimiento *in vitro*. La excreción de estos compuestos está relacionada con los estreses impuestos al tejido debido al corte, heridas, reguladores del crecimiento y los cambios en el ambiente durante el cultivo *in vitro*.

Lal *et al.* (2015) indicaron la conveniencia del tratamiento de los explantes de caña de azúcar con antioxidantes antes de ser colocados en el medio de cultivo o

una vez en él. Además, la frecuente transferencia de los explantes a medio de cultivo fresco y el mantenerlos en la oscuridad durante los primeros siete a diez días fueron recomendados como medidas efectivas en el control de los efectos adversos de los fenoles durante el establecimiento *in vitro*.

En esta misma especie vegetal, Bernal *et al.* (2021) demostraron que la combinación de brotes jóvenes de plantas crecidas en condiciones semicontroladas, con malla para sombra del 50% y suspensión del riego, redujo la producción de fenoles por las plantas. Esto pudo ser debido que en condiciones de luz reducida las plantas tienen menos cloroplastos, lugar donde se sintetizan y acumulan los compuestos fenólicos, los que se encuentran localizados en las membranas de los tilacoides.

Respecto a las variables número de brotes por disco y número total de brotes por cilindro, el material vegetal (plantas madre) procedentes de banco de donantes en condiciones semicontroladas y con el medio de cultivo M1 superó al resto de los tratamientos con diferencias significativas. Con respecto al control (método de cultivos de ápices), el nuevo método desarrollado a partir de disco de hojas en el medio M1 lo superó en un total de $49,0 \pm 3,4$ brotes *in vitro* por cilindro (Tabla 2 y Figura 5).

Varios autores como Gill *et al.* (2006), Joshi *et al.* (2013) y Sandhu *et al.* (2016) informaron la regeneración de plantas de forma directa a partir de discos de hojas inmaduras sin formación de callos en diferentes cultivares de caña de azúcar de la India, Estados Unidos de América

Tabla 2. Efecto de la procedencia del material vegetal y el medio de cultivo sobre el establecimiento *in vitro* a partir de discos de hojas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-445) a los 30 días de cultivo.

Procedencia del material vegetal	Kinetina (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	Nº de brotes/disco	Número de brotes con raíces (%)	No total de brotes por cilindro
Banco de Donante semicontrolado	0,5	5,0	13,5±2,5 a	100	49,0±3,4 a
Banco de Donante semicontrolado	1,0	5,0	7,3±1,3 b	100	26,5±2,1 b
Banco de Donante en Campo*	6 0,3 mg L ⁻¹		0	0	1,0±0,5 c

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Tukey y de proporciones para el caso del porcentaje para $p < 0,05$ (n=50) (*Control) MG±EE: Media General ± Error Estándar

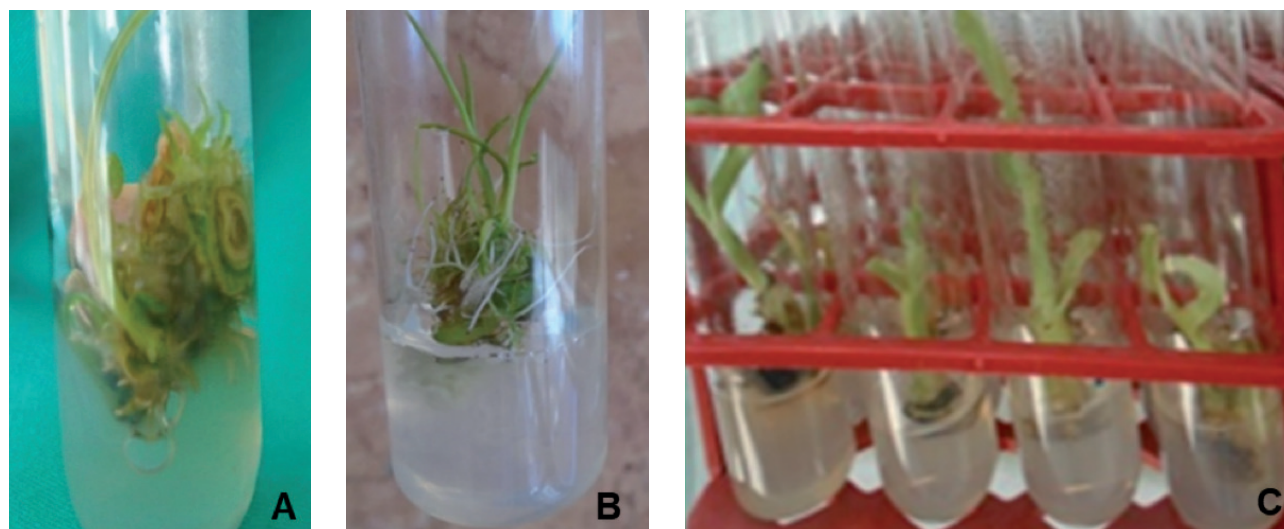


Figura 5. Comparación entre discos de hojas y ápices en la fase de establecimiento *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-445) a los 30 días de cultivo de plantas madres en Banco de Donantes en condiciones semicontroladas. (A) Disco de hojas con brotes *in vitro* (B) Discos de hojas con plantas completas (C) Brotes *in vitro* obtenidos a partir de ápices.

y Australia. Todos obtuvieron como mejor combinación de reguladores de crecimiento la kinetina ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) y el ANA ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$). La cantidad de brotes por cilindros varió desde 28 hasta 50 brotes *in vitro* en dependencia del cultivar. En todos los casos los materiales vegetales donantes fueron plantas de caña de azúcar creciendo en campo. Los resultados de esta investigación coinciden con lo señalado por estos autores en el cultivar cubano C97-445. Además, en el presente trabajo también se obtuvieron los mayores valores en el número de brotes *in vitro* por disco ($13,5 \pm 2,5$) y número total de brotes *in vitro* por cilindro ($49,0 \pm 3,4$) con la combinación de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de kinetina y $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ de ANA en el medio de cultivo.

Los discos de hojas inmaduras procedentes de plantas cultivadas en condiciones semicontroladas tuvieron una mejor respuesta que los discos provenientes de plantas creciendo en campo. Estos resultados apoyan la importancia de la calidad fisiológica y sanitaria del material de partida en el éxito del cultivo *in vitro*.

Antes de la selección de los materiales vegetales para la propagación *in vitro* debe realizarse un pretratamiento mediante fungicidas y bactericidas para minimizar la contaminación en el cultivo *in vitro*. Además, para aumentar las probabilidades de éxito la planta madre debe cultivarse en condiciones de invernadero para mantener la fisiología normal del cultivo, además de minimizar la contaminación *in vitro* (Cassells, 2005).

Al respecto, George and Debergh (2008) refieren que durante la Fase 0 o preparativa se persigue garantizar material vegetal de partida de alta calidad genética y fitosanitaria, la cual permita disminuir los problemas de contaminación por microorganismos para lograr un esquema de propagación *in vitro* real y repetible.

Según Rakesh *et al.* (2011), los explantes tomados de las plantas de campo tienen problemas de contaminación microbiana, ya que lograr la esterilización total es generalmente difícil. El estado fisiológico de la planta donante, además, también influye en la respuesta de los explantes. Al respecto, Tiwari *et al.* (2012) refirieron que los

explantes de plantas cultivadas en invernadero dan mejores resultados para la propagación *in vitro*, ya que la carga de contaminantes es mínima en comparación con los que crecen en condiciones de campo.

Estos autores, asimismo, señalaron que dependiendo de las condiciones climáticas durante el año existen enormes variaciones con respecto a la respuesta de los explantes al cultivo *in vitro* cuando provienen de plantas cultivadas en condiciones de campo.

Efecto de la posición del disco de hojas en el medio de cultivo para la regeneración de plantas *in vitro*

En todos los tratamientos se logró la formación de brotes (100% de respuesta) independientemente de la posición en el medio de cultivo y el número del disco. Respecto a la variable altura los mejores resultados se alcanzaron en la posición vertical usando el disco 3, y para la posición horizontal con los discos 2 y 3 sin diferencias significativas entre ellos. No obstante, la posición vertical usando el disco 3 y la horizontal con el disco de igual número no tuvieron diferencias significativas respecto a la posición vertical con el disco 1 (Figura 6). La altura promedio de las plantas estuvo por encima de los 3,0 cm, valor adecuado para pasar a la siguiente fase (Multiplicación).

Según informaron Gill *et al.* (2006), la formación de plantas a partir de discos de hojas inmaduras, independiente a la posición en que fueron colocados en el medio de cultivo para esta fase, fue entre un 75-80% en el cultivar de caña de azúcar CP88-1762 a los 45 días de cultivo. Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron superiores a los informados por estos autores, habiéndose logrado una respuesta del 100% de los explantes (discos de hojas inmaduras) para el cultivar C97-445.

Con relación al número de hojas, los mayores resultados se obtuvieron en los tratamientos en posición vertical con los discos 3 y 4, este último con un número de hojas similar al disco 5.

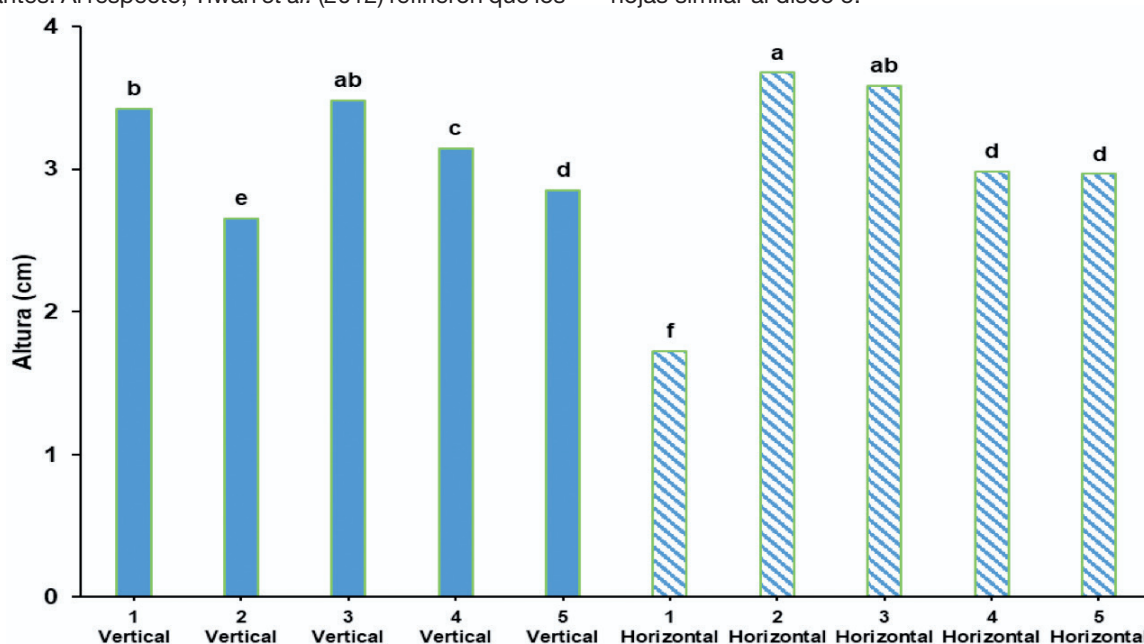


Figura 6. Efecto de la interacción posición del disco y número del disco de hojas inmaduras para la variable altura de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv C97-445) a los 30 días de cultivo.

En la posición horizontal el mayor número de hojas correspondió al disco 2 (Figura 7).

En el caso de la variable número de raíces, los mejores resultados solo fueron alcanzados en la posición vertical y específicamente con los discos 3 y 5, sin diferencias significativas entre ellos, pero sí con el resto de los tratamientos evaluados. La media del número de raíces en ambos tratamientos estuvo por encima de 6 (Figura 8).

Al respecto, Joshi *et al.* (2013) informaron que la mejor posición del disco de hojas para el número de raíces para tres cultivares de caña de azúcar de Canal Point (Florida) fue la horizontal. Los resultados de esta investigación son contrarios a los informados por estos autores, aunque cabe aclarar que estos trabajos se realizaron con diferentes cultivares de caña de azúcar. Diversos autores reconocen la influencia del genotipo en la respuesta del explante

en condiciones *in vitro* de cultivo, tanto en la caña de azúcar como en otras especies, lo cual podría explicar las diferencias reportadas anteriormente (Franklin *et al.*, 2006; Lakshmanan *et al.*, 2006; Taparia *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2013).

Para la variable número de brotes *in vitro* por explante, la más importante en la fase de establecimiento *in vitro*, los mejores resultados se alcanzaron con el disco 4 para ambas posiciones del explante, sin diferencias significativas entre ellas pero sí con el resto de los tratamientos (Figuras 9 y 10). Las medias del número de brotes fueron 29,0 y 27,5 $\pm$ 6,75 para la posición vertical y horizontal, respectivamente.

Joshi *et al.* (2013) señalaron que no encontraron para el número de brotes diferencias significativas según la posición del disco en el medio de cultivo (horizontal o

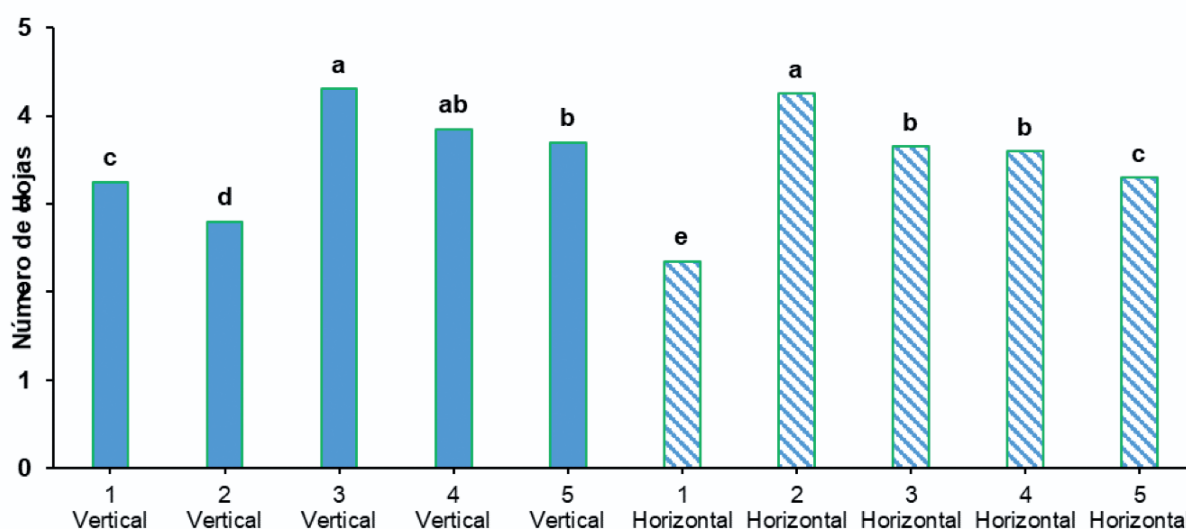


Figura 7. Efecto de la interacción posición del disco y número del disco de hojas inmaduras para la variable número de hojas de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv C97-445) a los 30 días de cultivo.

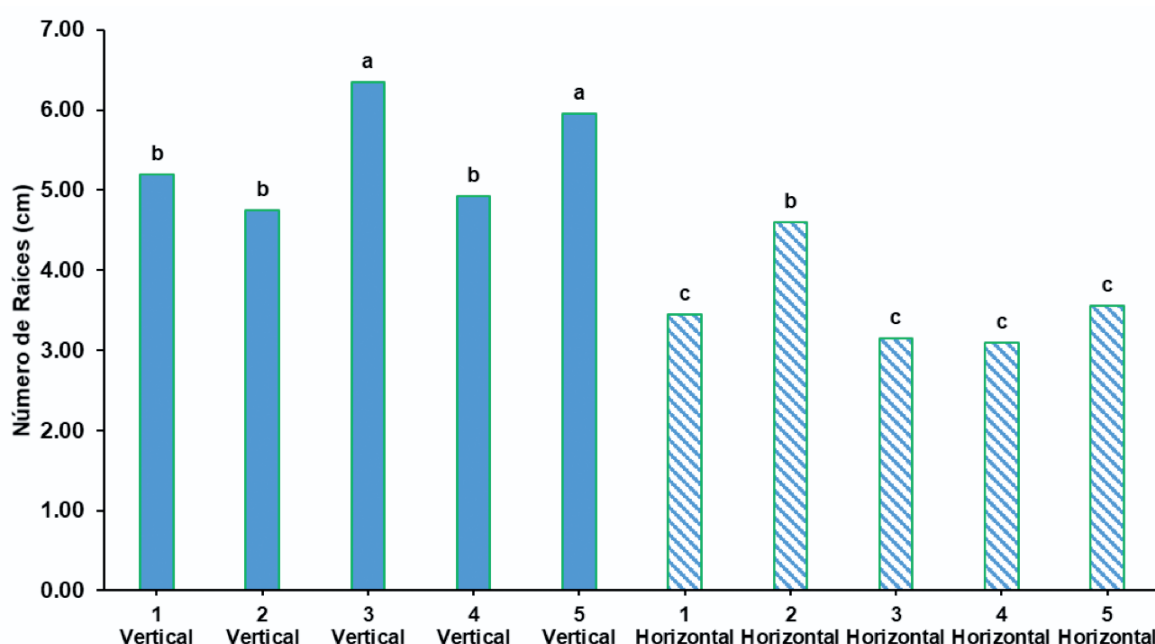


Figura 8. Efecto de la interacción posición del disco y número del disco de hojas inmaduras para la variable número de raíces de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv C97-445) a los 30 días de cultivo.

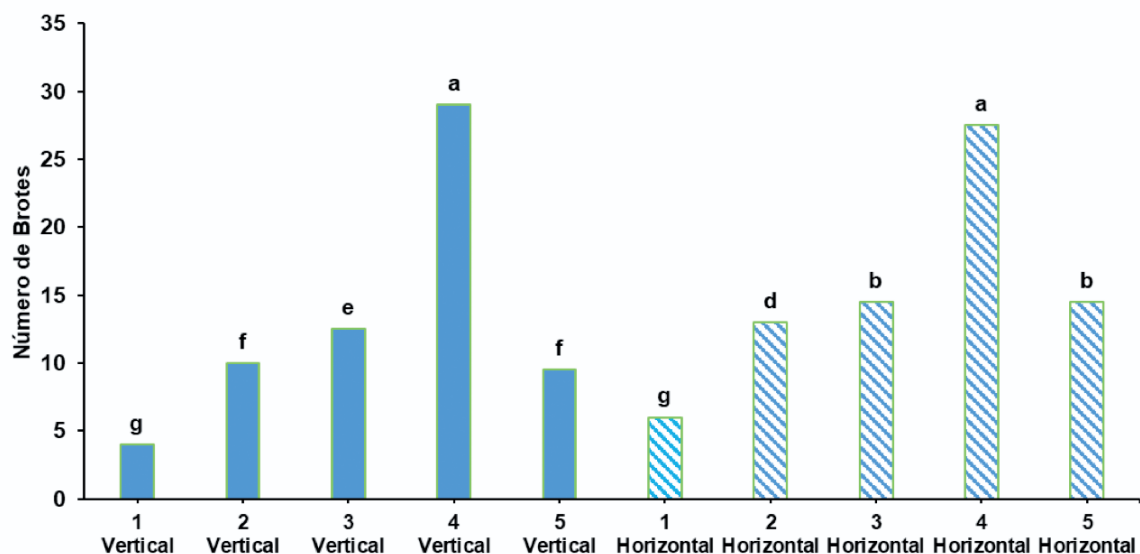


Figura 9. Efecto de la interacción posición del disco y número del disco de hojas inmaduras para la variable número de brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv C97-445) a los 30 días de cultivo.



Figura 10. Brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-445) obtenidos a partir del cuarto disco del cilindro, a los 30 días de cultivo.

vertical) en tres cultivares de caña de azúcar (CP84-1198, CP88-1762 y CP89-2143). Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan lo informado por estos autores. No obstante, Joshi *et al.* (2013) encontraron los mejores resultados para esta variable en el primer disco con diferencias significativas con el resto. Los valores obtenidos por estos autores fueron 15,5 para CP84-1198; 64,8 para CP88-1762 y 27,0 para CP89-2143.

Sin embargo, Lakshmanan *et al.* (2006) refirieron que en el cultivar de caña de azúcar Q165 los mejores resultados se lograron con los discos 1, 2, 3 y 4 y descartaron los discos 5 y 6. Estos autores señalaron que estos re-

sultados pudieron deberse al transporte polar de la auxina endógena en el cilindro de hojas. Todo parece indicar que los segmentos 2, 3 y 4 tienen la concentración de auxina endógena necesaria para inducir la formación de brotes, unido a la auxina exógena del medio de cultivo.

Para los segmentos 5 y 6 la concentración de la auxina fue crítica, lo cual redujo la cantidad de brotes formados. Para el caso de la presente investigación, tanto en el caso del disco 1 (muchas concentraciones de auxina endógena) y del disco 5 (baja concentración de auxina endógena) la concentración de este regulador de crecimiento resultó crítica para inducir la regeneración de brotes.

Además, a partir por los resultados obtenidos se pudo inferir que utilizando los discos 2, 3 y 4 en el cultivar C97-445 se alcanzó un alto número de brotes (55 por cilindro). Esto permitió un ahorro de medio de cultivo, mano de obra, tiempo y espacio, lo que hace más eficiente la metodología de establecimiento *in vitro* de la caña de azúcar empleando discos de hojas inmaduras. Es importante señalar que en la presente investigación se utilizó un sistema de regeneración de plantas directa o de un solo paso, de fácil repetitividad (Figura 11).

CONCLUSIONES

1. El empleo de plantas madre procedentes de un Banco de Donantes en condiciones semicontroladas permite lograr bajos índices de oxidación fenólica y contaminación microbiana y una mayor cantidad de brotes a partir de un cilindro de hojas en comparación a utilizar plantas madres procedentes de un Banco de Donantes en campo.

2. La mejor combinación de medio de cultivo fue de 0,5 mg l⁻¹ de kinetina y 5,0 mg l⁻¹ de ANA con los mayores valores en el número de brotes *in vitro* por disco (13,5±2,5) y número total de brotes *in vitro* por cilindro (49,0±3,4) en el cultivar de caña de azúcar C97-445, a los 30 días de cultivo.

3. Se demostró que el segmento 4 fue el de mayor número de plantas por disco; unido con los segmentos 2 y 3 permite obtener un total de 55 plantas en el cultivar

Actualización del Protocolo

Fases de la propagación *in vitro* en la caña de azúcar

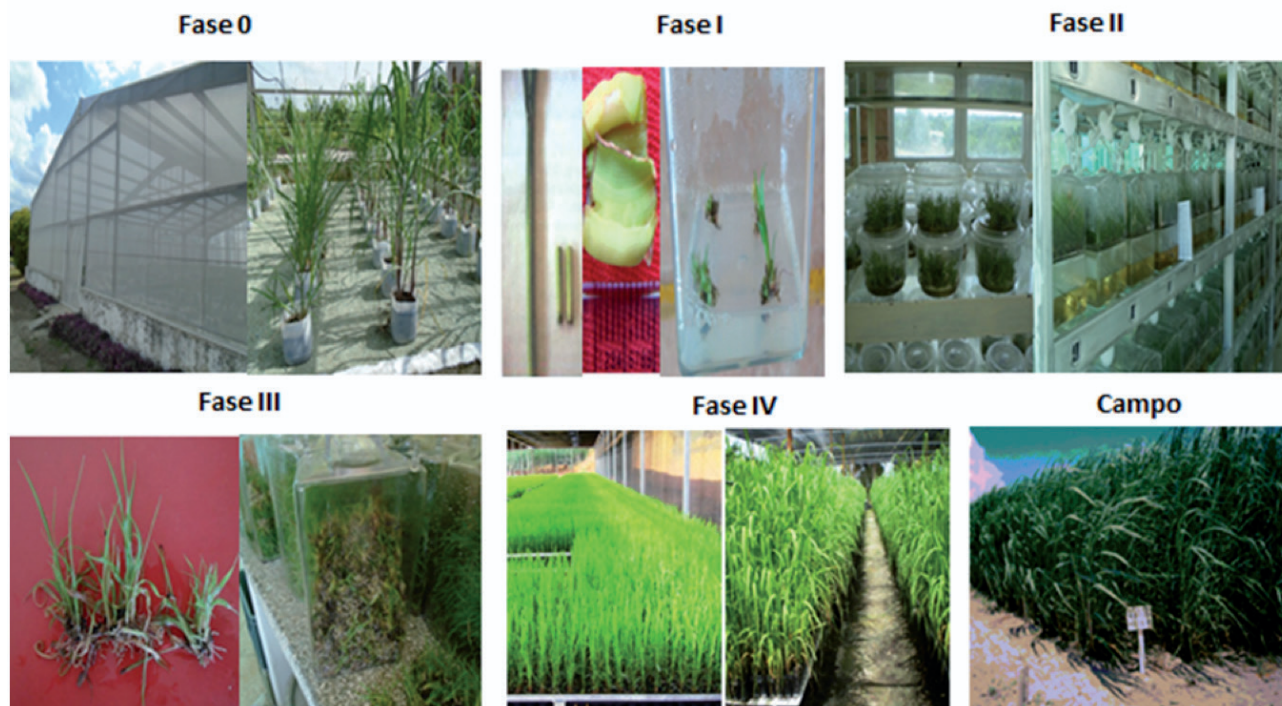


Figura 11. Nueva metodología para la propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a partir de discos de hojas procedentes de Banco de Donantes en condiciones semicontroladas.

de caña de azúcar C97-445.

4. Los resultados obtenidos en este estudio pueden aplicarse para la propagación masiva *in vitro* de cultivares de caña de azúcar, logrando reducir el período de tiempo requerido y asegurando los estándares de calidad del material obtenido.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Bernal Villegas, A.; P. Machado Armas; D. Núñez Jaramillo; E. A. Toledo Rodríguez; R. Gómez Kosky; A. S. Noguera y A. Castagnaro. 2021. Establecimiento de un banco de plantas madre de caña de azúcar en condiciones semicontroladas para la propagación *in vitro*. Revista Biotecnología Vegetal 21 (1): 53 - 61.
- Cabrera, A. M. 2003. Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores del crecimiento en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var Salcajá. Tesis de Grado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Cassells, A. 2005. Problems in tissue culture: culture contamination. En: Micropropagation. Springer, Netherlands, pp. 31-44.
- Díaz, M. E.; M. Francisca Perera; N. V. Paz; P. Insaurralde Rocco; N. S. Ovejero; A. M. Cerviño; A. P. Castagnaro y A. S. Noguera. 2020. Proceso de producción de vitroplantas de caña de azúcar de pureza genética y sanidad garantizadas en etapa de laboratorio en la EEAOC. Rev. ind. agric. Tucumán 97 (2): 39-44.
- Duhem, K.; N. Le Mercier and P. Boxus. 1988. Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. Acta Horticulturae 225: 67-75.
- Franklin, G. S.; C. J. Arvinth; M. Sheeba; N. Kanchana and M. Subramonian. 2006. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) mirib segment explants. Plant Growth Regul. 50: 111-119.
- George, E. F. and P. Debergh. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. En: E. F. George *et al.*, (eds.). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Springer, O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands pp. 29-64.
- Gill, R.; P. K. Malhotra and S. S. Gosal. 2006. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. Plant Cell Tiss Organ Cult 84: 227-231.
- Heinz, D.J. and G. W. P. Mee. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop Science. 9: 346-348.
- Jiménez, E.; L. García; M. Suárez y Y. Alvarado. 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.Cuba.119p.
- Jorge, H.; R. González; M. Rodríguez; G. A. Hernández; A. L. Jiménez; H. García; R. González; R. Almeida; S. Guillén; I. Alfonso; F. R. Díaz y I. Torres. 2022. XXVII Reunión Nacional de Variedades, Semillas y Sanidad Vegetal. Revista Cuba Caña, Suplemento Especial: 1-48.

- Joshi, S.; J. Mukesh; B. L. Tillman; F. Altpeter and M. Gallo. 2013.** Comparative analysis of direct plant regeneration from immature leaf whorl and floral explants for three elite US sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) genotypes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 49: 674-681.
- Kaur, A. and J. S. Sandhu. 2015.** High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agri-business industry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 339-350.
- Lakshmanan, P., Geijskes, R.J., Wang, L., Christopher, A.P., Grof, L., Berding, N. and Smith GR, 2006.** Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Rep.* 25:1007-1015.
- Lal, M.; A. K. Tiwari and G. N. Gupta. 2015.** Commercial scale micropropagation of sugarcane: Constraints and remedies. *Sugar Tech.* 17: 339-347.
- Muhitch, M. and J. Fletcher. 1985.** Influence of culture age and seeps treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. *Plant Physiology* 78: 25-28.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- North, J. J.; P. A. Ndakidemi and C. P. Laubscher. 2012.** Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal Physical Science* 74: 638-646.
- Pérez, J. 1998.** Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Jiménez, E. y D. Agramonte (eds.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba, pp.179-191.
- Portal Caña. 2022.** Área cultivada en el mundo con caña de azúcar y principales productores. Disponible en: <http://www.portalcana.com.ar>. [Consultado: 9 de junio de 2022].
- Rakesh, S.; S. Kaur and S. Garg. 2011.** Role of tissue culture technique in high sugarcane production. *International Research Journal Life Science Leaflets* 21(2): 1008-1017.
- Ramasamy, M.; V. Mora; M. B. Damaj; C. S: Padilla; N. Ramos; D. Rossi; N. Solís-Gracia; C. Vargas-Bautista; S. Irigoyen; J. A. Da Silva; T. E. Mirkov and K. K. Mandadi. 2018.** A biolistic-based genetic transformation system applicable to a broad-range of sugarcane and energy cane varieties. *M. Crops and Food* 00:1-17.
- Sandhu, S. J.; M. Kaur; A. Kaur and A. Kalia. 2016.** Single step direct transgenic plant regeneration from adventive embryos of agro-infected sugarcane (*Saccharum* spp.) spindle leaf roll segments with assured genetic fidelity. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 12 (3): 234-238.
- Taparia, Y.; W. M. Fouad; M. Gallo and F. Altpeter. 2012.** Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol. Plant.* 48:15-22.
- Tiwari, A.; S. Tripathi; M. Lal and S. Mishra. 2012.** Screening of some chemical disinfectants for media sterilization during *in vitro* micro propagation of sugarcane. *Sugar Tech* 14 (4): 364-369.
- Thorpe, T. 2014.** History of Plant Tissue Culture. *Methods in Molecular Biology*, En: Loyola-Vargas, V. M. and F. Vázquez-Flota (eds.). *Plant Cell Culture Protocols*, Second Edition, Totowa, pp. 411.