

Universidad de Ciego de Avila

Centro de Bioplasmas

**MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp. híbrido*)
EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL Y SU
RELACIÓN CON LA EXCRECIÓN DE FENOLES.**

Tesis para optar por el grado científico de

Doctor en Ciencias Agrícolas.

Autor: Ing. José Carlos Lorenzo Feijoo.

Tutor: Dr. Carlos Guillermo Borroto Nordelo.

Ciego de Avila, 2000

A mi pequeña familia: Doris y Carlos Manuel.

A mi gran familia.

Muchos me han allanado el camino hacia la terminación de este trabajo: colegas del Centro de Bioplasmas; UNICA; EPICAs de Ciego de Ávila, Jovellanos, Villa Clara; investigadores; técnicos; estudiantes. Mencionarlos a todos constituiría una lista interminable e innecesaria porque es sabido quiénes son.

Sin embargo, quisiera citar a aquellos doctores que han contribuido directamente en la elaboración del documento. Un agradecimiento especial merece Carlos Borroto. Además, debo mencionar a Nancy García, Maritza Escalona, Reinaldo Trujillo, Marcos Daquinta, María Emilia Aspiolea, Eulalia Ojeda, Walfredo Torres, Daniel Agramonte y Antonio Sigarroa.

Con todos estaré en deuda siempre.

RESUMEN.

Este trabajo se realizó con el propósito de comprobar la hipótesis siguiente: **El protocolo para la micropropagación de la caña de azúcar utilizado actualmente en Cuba puede mejorarse mediante el incremento de la eficiencia de la formación de brotes con el uso de la inmersión temporal y tal incremento está influido por la excreción de fenoles.** Para la comprobación de esta hipótesis se trazaron dos objetivos: **1)** Desarrollar un nuevo protocolo para la formación de brotes de calidad en caña de azúcar, más eficiente biológica y económicamente, mediante el uso de la inmersión temporal y el manejo de diferentes condiciones experimentales; y **2)** Evaluar bajo las mejores condiciones experimentales establecidas en este trabajo, algunos aspectos de la relación entre la producción de fenoles y el proceso de formación de brotes de caña de azúcar. El documento se divide en dos partes en correspondencia con los objetivos trazados. En la primera parte, se estableció un nuevo protocolo para la formación de brotes que incluye las etapas siguientes: **1)** Formación de brotes en sistemas de inmersión temporal con 50 mL de medio de cultivo por explante, 8 inmersiones por día, y 1.0 mg/L de paclobutrazol (30 días); y **2)** Alargamiento de los brotes en sistemas de inmersión temporal con 1.0 mg/L de ácido giberélico (15 días). Dicho procedimiento es aproximadamente 7.5 veces más eficiente desde el punto de vista biológico y sus costos representan el 60% del usado actualmente (estos resultados dependen de la variedad con la que se trabaje). Se aplica a escala comercial en las biofábricas de las Estaciones Provinciales de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Villa Clara y Jovellanos desde finales de 1997. La nueva forma de ahijamiento no tiene efecto en las etapas posteriores de enraizamiento, aclimatización ni después de 9 meses de crecimiento en campo. En el ámbito mundial, este trabajo constituye el primer procedimiento desarrollado para la micropropagación de la caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal. En la segunda parte del documento se trabajó bajo las mejores condiciones experimentales establecidas anteriormente y se estudió la relación del ahijamiento con la excreción de fenoles. Inicialmente se cuantificaron los cambios de la masa fresca, la masa seca, el número de brotes, y el contenido de fenoles en el medio de cultivo con el cursar de la proliferación en sistemas de inmersión temporal. Las variaciones de las masas fresca y seca no estuvieron estrechamente relacionadas con la excreción de fenoles al medio de cultivo ya que aumentaron continuamente. Sin embargo, la reducción de la formación de

nuevos brotes ocurrió simultáneamente con la disminución marcada del contenido de fenoles en el medio de cultivo. Cuando los explantes de los sistemas de inmersión temporal se subcultivaron con medio fresco cada diez días, la formación de brotes se redujo notablemente en la segunda decena. Esto indicó que los productos de excreción son importantes en los primeros días cuando los brotes no han proliferado lo suficiente para reponer los compuestos perdidos con el subcultivo. El ácido gálico representó el 82% de los fenoles excretados y cuando se aplicó exógenamente fue capaz de contrarrestar el efecto negativo del subcultivo en las etapas tempranas de la proliferación. La inclusión de cisteína en el medio de cultivo no afecta la acumulación de masa fresca pero sí la excreción de fenoles y la formación de brotes. Esto reafirma la conexión existente entre estos dos últimos indicadores. Los tratamientos más importantes que condujeron al establecimiento del nuevo protocolo desarrollado en este trabajo, incrementaron tanto la formación de brotes como la excreción de fenoles. La relación entre las variables fenoles y brotes refleja una línea recta cuyo coeficiente de determinación es del 96%. El establecimiento de esta relación para el caso particular de la caña de azúcar forma parte de la novedad científica de esta tesis.

ÍNDICE

Contenido.	Página
1. Introducción.	1
2. Revisión bibliográfica.	6
2.1 Introducción al cultivo de la caña de azúcar.	6
2.2 Algunos factores que afectan la proliferación <i>in vitro</i> .	9
2.3 Cambio del contenido de fenoles durante la micropropagación.	18
3. Materiales y métodos.	26
3.0 Generalidades sobre los experimentos y tratamiento estadístico de los datos.	26
3.1 <u>Primera parte:</u> Desarrollo del nuevo protocolo para la formación de brotes de calidad de caña de azúcar mediante el uso de la inmersión temporal y el manejo de diferentes condiciones experimentales.	28
3.1.1 Comparación de tres métodos de micropropagación: medio semi-sólido, medio líquido e inmersión temporal.	28
3.1.2 Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	30
3.1.3 Efecto de la frecuencia de inmersión en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	30
3.1.4 Efecto de la adición de paclobutrazol al medio de cultivo en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	32
3.1.5 Efecto del ácido giberélico después de la formación de brotes con paclobutrazol en sistemas de inmersión temporal.	34
3.1.6 Comparación entre las plantas obtenidas en la micropropagación convencional y en inmersión temporal durante la fase de enraizamiento.	34
3.1.7 Comparación entre las plantas obtenidas en la micropropagación convencional y en inmersión temporal durante la fase de aclimatización.	37
3.1.8 Comparación entre las plantas de inmersión temporal con testigos de la micropropagación convencional y de propagación vegetativa durante el crecimiento en campo.	38
3.1.9 Comparación de los costos de producción de las fases de formación de brotes en la micropropagación convencional y en sistemas de inmersión temporal.	40
3.1.10 Evaluación del protocolo de micropropagación en sistemas de inmersión temporal con otras variedades.	40
3.2 <u>Segunda parte:</u> Evaluación de algunos aspectos de la relación entre la producción de fenoles y el proceso de formación de brotes de caña de azúcar.	40
3.2.1 Cambios de la proliferación y del contenido de fenoles en el medio de cultivo durante la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	41
3.2.2 Efecto del subcultivo con medio fresco en la proliferación en sistemas de inmersión temporal.	42
3.2.3 Efecto del ácido indolacético y el ácido gálico en la proliferación en sistemas de inmersión temporal.	42
3.2.4 Efecto de la cisteína en la proliferación y el contenido de fenoles en el medio de cultivo durante la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	44
3.2.5 Efecto de la inmersión temporal, el incremento del volumen de medio de	46

cultivo por explante y el paclobutrazol en la formación de brotes y la producción de fenoles.

4. Resultados y discusión.	50
4.1 <u>Primera parte:</u> Desarrollo del nuevo protocolo para la formación de brotes de calidad de caña de azúcar mediante el uso de la inmersión temporal y el manejo de diferentes condiciones experimentales.	50
4.1.1 Comparación de tres métodos de micropropagación: medio semi-sólido, medio líquido e inmersión temporal.	50
4.1.2 Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	53
4.1.3 Efecto de la frecuencia de inmersión en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	57
4.1.4 Efecto de la adición de paclobutrazol al medio de cultivo en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	60
4.1.5 Efecto del ácido giberélico después de la formación de brotes con paclobutrazol en sistemas de inmersión temporal.	63
4.1.6 Comparación entre las plantas obtenidas en la micropropagación convencional y en inmersión temporal durante la fase de enraizamiento.	67
4.1.7 Comparación entre las plantas obtenidas en la micropropagación convencional y en inmersión temporal durante la fase de aclimatización.	70
4.1.8 Comparación entre las plantas de inmersión temporal con testigos de la micropropagación convencional y de propagación vegetativa durante el crecimiento en campo.	72
4.1.9 Comparación de los costos de producción de las fases de formación de brotes en la micropropagación convencional y en sistemas de inmersión temporal.	80
4.1.10 Evaluación del protocolo de micropropagación en sistemas de inmersión temporal con otras variedades.	84
4.2 <u>Segunda parte:</u> Evaluación de algunos aspectos de la relación entre la producción de fenoles y el proceso de formación de brotes de caña de azúcar.	86
4.2.1 Cambios de la proliferación y del contenido de fenoles en el medio de cultivo durante la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	86
4.2.2 Efecto del subcultivo con medio fresco en la proliferación en sistemas de inmersión temporal.	92
4.2.3 Efecto del ácido indolacético y el ácido gálico en la proliferación en sistemas de inmersión temporal.	95
4.2.4 Efecto de la cisteína en la proliferación y el contenido de fenoles en el medio de cultivo durante la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.	98
4.2.5 Efecto de la inmersión temporal, el incremento del volumen de medio de cultivo por explante y el paclobutrazol en la formación de brotes y la producción de fenoles.	102
5. Conclusiones.	106
6. Recomendaciones.	108
7. Bibliografía.	109

1. INTRODUCCIÓN.

La caña de azúcar es uno de los cultivos más importantes dentro de la agricultura cubana. Su propagación implica un proceso largo de 32 a 36 meses desde la plantación de la “semilla” básica hasta llegar a la certificada (Gálvez y Almeida, 1996). Dicho proceso requiere la ocupación de grandes áreas y el consumo de tallos que no se destinan a la producción de azúcar. Las dos razones anteriores, entre otras, hacen necesario el desarrollo de métodos más eficientes para la propagación de este cultivo.

La combinación de métodos de propagación vegetativa tradicional con técnicas de micropropagación constituye una de las estrategias que se emplea actualmente en Cuba (Ojeda *et al.*, 1999). En ambos casos, se trabaja para su perfeccionamiento y esta tesis forma parte de la estrategia nacional encaminada al mejoramiento del segundo grupo mencionado. En las biofábricas se utiliza de forma generalizada el protocolo de micropropagación recomendado por Jiménez (1995). Este ha permitido el aumento de la disponibilidad de material de propagación pero la demanda todavía supera a la oferta.

En los últimos años se ha trabajado en la embriogénesis somática (Jiménez, 1995) y la semilla artificial de la caña de azúcar (Nieves *et al.*, 1998) como vías para incrementar la eficiencia de su proliferación *in vitro*. Todo parece indicar que estos procedimientos serán los llamados a revolucionar la propagación de este cultivo a mediano plazo. Sin embargo, son muy dependientes del genotipo y es necesario vencer barreras biológicas importantes antes de explotarlos en gran escala. Por otra parte, requieren inversiones relativamente grandes. De ahí

la significación del desarrollo de métodos más eficientes basados en la organogénesis. Dentro de estas técnicas se encuentra la inmersión temporal.

Alvard *et al.* (1993), Teisson y Alvard (1995), y Etienne *et al.* (1997) han empleado la técnica de inmersión temporal para la micropropagación de varios cultivos. Los más importantes han sido café (*Coffea arabica*), caucho (*Hevea brasiliensis*), plátano (*Musa sp.*), palma de aceite (*Elaeis guineensis*) y cítricos (*Citrus sp.*). En Cuba también se ha trabajado con este principio y en 1996, la Dra. Maritza Escalona (Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Avila) presentó la primera ponencia sobre este tema en el marco del XI Foro Nacional de Ciencia y Técnica. Posteriormente, han aparecido trabajos sobre su uso para la proliferación *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) (Escalona *et al.*, 1999); para la embriogénesis somática del banano (Gómez *et al.*, 1999; citados por Herman, 1999) y su organogénesis (Daquinta *et al.*, 2000a, 2000b); y para la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) (Jiménez *et al.*, 2000).

En todos los casos mencionados anteriormente, la técnica de inmersión temporal y variaciones de ciertas condiciones de cultivo han resultado en incrementos notables de la proliferación *in vitro*. Por eso, la necesidad actual de aumentar la oferta de propágulos de caña de azúcar junto al éxito de la inmersión temporal en otras especies de plantas, han sido una de las causas del desarrollo del presente trabajo de tesis.

La conducción de esta investigación tuvo dos precedentes principales: el protocolo de Jiménez (1995) para la micropropagación convencional de la caña de azúcar; y la metodología

establecida por Escalona (1999) para la proliferación de la piña en sistemas de inmersión temporal. El primero requería incrementos de su eficiencia. En el último caso, quedaron aspectos pendientes a futuras elucidaciones y que se esclarecieron en la presente investigación con caña de azúcar. Entre ellos se encuentran: la comparación de la micropropagación convencional y la inmersión temporal; la definición de óptimos de algunos factores que influyen en la proliferación (frecuencia de inmersión, concentración de paclobutrazol, concentración de ácido giberélico para el alargamiento); y estudios fenotípicos en campo que abarcan la cosecha del fruto agrícola. En el ámbito mundial, la primera publicación sobre el cultivo de la caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal apareció como resultado de la conducción de este trabajo de tesis (Lorenzo *et al.*, 1998). Este nuevo procedimiento se aplica a escala comercial en las biofábricas de las Estaciones Provinciales de la Caña de Azúcar de Jovellanos y Villa Clara desde finales de 1997 y ha conducido a una mayor producción de vitroplantas con costos menores.

Por otra parte, todos los experimentos desarrollados en esta tesis con el propósito de incrementar la brotación de la caña de azúcar estuvieron asociados con cambios de color del medio de cultivo. En general, dichos cambios se han asociado históricamente con el metabolismo de los fenoles después de su oxidación por la enzima polifenoloxidasa (Herman, 1991).

Varios investigadores han hecho referencia a las variaciones del contenido de fenoles durante la micropropagación de una gran gama de especies de plantas. Algunos refieren correlaciones negativas entre los indicadores de proliferación y el contenido endógeno de

fenoles (Chirek, 1990; Legrand y Bouazza, 1991; Hrubcová *et al.*, 1994; Beruto *et al.*, 1996; Cvikrová *et al.*, 1996), mientras otros señalan lo contrario (Compton y Preece, 1988a, 1988b; Preece y Compton, 1991; Herman, 1991). En el caso particular de la caña de azúcar, la relación entre los fenoles y la proliferación no ha sido cuantificada por lo que se abordó en la presente tesis.

Basada en los planteamientos anteriores, la tesis estuvo encaminada a la comprobación de la hipótesis siguiente:

El protocolo para la micropropagación de la caña de azúcar utilizado actualmente en Cuba puede mejorarse mediante el incremento de la eficiencia de la formación de brotes con el uso de la inmersión temporal y tal incremento está influido por la excreción de fenoles.

Para la comprobación de esta hipótesis se plantearon dos objetivos:

- 1) Desarrollar un nuevo protocolo para la formación de brotes de calidad en caña de azúcar, más eficiente biológica y económicamente, mediante el uso de la inmersión temporal y el manejo de diferentes condiciones experimentales.
- 2) Evaluar bajo las mejores condiciones experimentales establecidas en este trabajo, algunos aspectos de la relación entre la producción de fenoles y el proceso de formación de brotes de caña de azúcar.

A continuación se resume la novedad científica y el valor práctico del trabajo de tesis:

Novedad científica: Se describe por primera vez en el mundo el establecimiento de un protocolo para el ahijamiento de la caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal. Por otra parte, la relación entre la producción de fenoles y la brotación de este cultivo no se había cuantificado hasta el momento.

Valor práctico: El protocolo establecido en esta tesis es aproximadamente 7.5 veces más eficiente desde el punto de vista biológico que el empleado en la mayoría de las biofábricas cubanas. Sus costos representan alrededor del 60%.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Introducción al cultivo de la caña de azúcar.

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum* y es miembro de la tribu Andropogoneae de la familia Poaceae. Otros géneros como *Erianthus* y *Miscanthus* están relacionados con el “complejo *Saccharum*” y pudieron haber contribuido a la evolución del cultivo. Las seis especies que conforman el género *Saccharum* se denominan: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* y *S. edule*. Sin embargo, se piensa que las tres últimas especies sean de origen interespecífico y/o intergenérico natural, y probablemente debieran considerarse como un grupo hortícola (Grassl, 1977; Daniels y Roach, 1987).

S. spontaneum es una especie silvestre, altamente polimórfica y adaptable, que crece en los trópicos y subtropicos desde África hasta la isla Salomón y Japón, con la India como centro de origen y de diversidad (Daniels *et al.*, 1975). *S. robustum* es otra especie silvestre con una distribución natural desde Borneo, a través de Nueva Guinea, hasta Nueva Hébridas (Price, 1965). *S. officinarum* es la especie domesticada productora de azúcar, la cual se ha encontrado en jardines nativos y se piensa que se deriva de *S. robustum* (Daniels y Roach, 1987). Los clones comúnmente cultivados provienen de cruzamientos interespecíficos realizados a principios del siglo XX entre las especies *S. officinarum* y *S. spontaneum* (Glaszmann y D'Hont, 1999). Se considera que la colección mundial actual está constituida por 8 550 accesiones aproximadamente con representantes de especies silvestres y cultivadas, así como, de otros géneros afines (Berding y Koike, 1987). La colección cubana está compuesta por 2 861 genotipos, de los que 275 son formas originales de diferentes especies de *Saccharum* y géneros afines, 431 son híbridos en diferentes etapas generacionales y 2 115 son híbridos comerciales (Pérez *et al.*, 1997)

La biología reproductiva de las diversas especies de caña de azúcar no ha sido objeto de estudios importantes, ya que todas tienen una propagación vegetativa profusa. Estas se distribuyen en la naturaleza de diferentes formas, que van desde amplias extensiones aparentemente de un solo clon, hasta distribuciones complejas con un entrecruzamiento activo entre varias especies o géneros. En condiciones de cultivo, las cañas son propagadas mediante segmentos de tallo y la población se establece gracias a la brotación de las yemas axilares (Glaszmann y D'Hont, 1999). Dentro de los métodos tradicionales de propagación vegetativa pueden mencionarse: el método inductivo o *seblang*, el de yemas aisladas, el *rayungan*, el *tjeblok*, y el de trozos de tallo (Pérez y Rodríguez, 1989).

En este cultivo, también se ha trabajado en el desarrollo de procesos de propagación *in vitro* en gran escala basados en la organogénesis y la embriogénesis somática (Sauvaire y Galzy, 1978, 1981; Hendre *et al.*, 1983; Lee, 1987; Grisham y Bourg, 1989; Peros y Bonnel, 1990; Felmand *et al.*, 1994; Jiménez, 1995; Jiménez *et al.*, 1995; Santana *et al.*, 1997). Estos procesos de micropropagación tienen gran potencial y son usados en general para producir propágulos de calidad en cantidades relativamente pequeñas. Dichos propágulos se emplean como plantas madres que después se multiplican por los métodos convencionales de propagación agámica para la obtención de semilla comercial (Glaszmann y D'Hont, 1999). Esta estrategia se emplea actualmente en Cuba. Sin embargo, la demanda de material de plantación supera a la oferta y ha promovido el desarrollo de investigaciones encaminadas a incrementar la eficiencia biológica y económica de los procedimientos de propagación de este cultivo.

También se ha utilizado la propagación *in vitro* de la caña de azúcar para el mejoramiento genético (Krishnamurthi y Tlaskal, 1974; Liu y Chen, 1980; Larkin y Scowcroft, 1981; Liu, 1981; Pérez *et al.*, 1995). El saneamiento ha sido otro de los objetivos de la micropropagación en esta especie (Mori, 1971; Lee, 1986).

Los estudios fisiológicos más importantes sobre la caña de azúcar se produjeron en la década del 50 después que el carbono 14 estuvo disponible. Con su uso se conoció el movimiento de los azúcares en el parénquima y se realizó el descubrimiento del ciclo C4 del carbono en este cultivo (Glasziou, 1960; Hatch y Slack, 1966). A partir de los años 70 esos estudios sobre fotosíntesis se profundizaron en Cuba con el enfoque de productividad (Ortega *et al.*, 1989) y calidad del jugo (De Armas *et al.*, 1999).

Recientemente se logró el aislamiento y la caracterización del gen que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa, dos genes que codifican proteínas transportadoras de glucosa y la secuenciación parcial del gen de la sacarosa sintetasa (Albert *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1992; Tang y Sun, 1993). Actualmente se continúan los estudios relacionados con genes que regulan la síntesis y almacenamiento de la sacarosa (De Armas, 1999). Otros estudios fisiológicos de la caña de azúcar han estado relacionados con el abastecimiento de agua (Ortega *et al.*, 1984) y nutrientes minerales (Martín *et al.*, 1987), así como, el proceso de maduración (De Armas *et al.*, 1999). Estudios fisiológicos *in vitro* sobre el papel de los fenoles en la micropropagación de la caña de azúcar no se han realizado hasta el momento.

2.2. Algunos factores que afectan la proliferación *in vitro*.

Entre los factores más estudiados actualmente para el incremento de la proliferación *in vitro* de plantas se encuentran: el sistema de cultivo, la densidad de cultivo, y el uso de inhibidores del crecimiento. Cuando se habla de sistemas de cultivo de plantas se refiere a tres grupos principales: el cultivo en medio semi-sólido; el cultivo en medio líquido; y al cultivo en sistemas más o menos automatizados. Desde hace varios años se tienen referencias del papel decisivo de este factor en la respuesta morfogénica de las plantas durante la micropropagación.

Okamura (1991) informó del desarrollo de un sistema mejorado para la embriogénesis somática de la alfalfa (*Medicago sativa*). La técnica involucra la formación de embriones somáticos a partir de callos cultivados en medio semi-sólido. Posteriormente, los callos se pasan para medio líquido y se agitan con el objetivo de separar los embriones. Además de la separación de los embriones, el medio líquido permite la evaluación y aislamiento de los genotipos capaces de regenerar mediante la determinación del número de embriones formados. Después del desarrollo en medio líquido, los embriones maduros en estado de torpedo se colocan nuevamente en medio semi-sólido para la conversión en plantas. Con el uso de la secuencia semisólido-líquido-semisólido, el autor logró el aislamiento de un clon mejorado que es capaz de producir un número mayor de embriones torpedo fácilmente convertibles en plantas.

La decisión sobre qué estado físico del medio de cultivo emplear (semi-sólido o líquido) parece estar estrechamente vinculada con el cultivo en particular y el proceso de regeneración con el que se trabaje (Epp, 1987). Meker (1977) refiere que la proliferación de algunas especies de *Tillandsias* es superior en medio semi-sólido en comparación con el medio líquido.

Por otra parte, Ziv y Hadar (1991) desarrollaron un sistema de cultivo para la micropropagación de helechos. En cultivos en agar, los ápices mostraron un gran crecimiento foliar pero en medio líquido, el desarrollo de las hojas es limitado. Los cultivos en medio líquido produjeron agregados de meristemoides, los que al separarlos mecánicamente, se desarrollaron como plantas normales después del paso a la aclimatización.

Escalona *et al.* (1999) indican la superioridad del medio líquido para la proliferación de la piña en comparación con el medio semi-sólido. Otros autores han señalado las ventajas del cultivo en medio líquido para la formación de brotes (Harris y Mason, 1983), el crecimiento de los mismos (Skidmore *et al.*, 1988), y en la embriogénesis somática (Gawel y Robacker, 1990). La ausencia de gelificantes incrementa la disponibilidad de agua y sustancias disueltas para los explantes (Debergh, 1983).

Por otra parte, Jiménez (1995) señala que la multiplicación de brotes de caña de azúcar es similar en los medios solidificados con agar y en los medios líquidos. Lal y Singh (1993) informan de la superioridad de los medios líquidos (agitación y estáticos) en la proliferación de la caña de azúcar en comparación con los medios gelificados. Dichos autores destacan también el incremento de la masa fresca de los explantes.

Dentro de los experimentos con medio líquido, también se refieren ventajas de la agitación en comparación con los cultivos estáticos para la micropropagación de la piña (Mathews y Rangan, 1979). Jiménez (1995) hace mención a la disminución del coeficiente de

multiplicación de la caña de azúcar en subcultivos continuos en medio líquido. Por ello, el autor recomienda su uso en los últimos subcultivos de la etapa de proliferación. Esto tiene un efecto adicional sobre los costos de producción porque aumenta la eficiencia de los operarios en una etapa donde se manejan grandes cantidades de plantas.

Aunque el uso del medio líquido para la propagación en gran escala de plantas permite el empleo de biorreactores y la mecanización del proceso, la micropropagación comercial usa ampliamente los medios semi-sólidos. Los obstáculos principales para el uso del medio líquido son: la susceptibilidad de las plantas al estrés de corte en los biorreactores, y la hiperhidricidad de los micropropágulos obtenidos en el medio líquido (Herman, 1995). Sin embargo, una serie de investigadores tienen más éxito con los cultivos en medio líquido. Algunos han diseñado aparatos automáticos para la micropropagación que eliminan las desventajas del medio líquido y otros han empleado retardantes del crecimiento para evitar la hiperhidricidad.

Una gran variedad de biorreactores se ha diseñado para el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Entre ellos se encuentran tres grupos principales: biorreactores de nebulización, biorreactores de soporte fijo, y sistemas de inmersión temporal. Woo y Park (1993) diseñaron un biorreactor de nebulización. El sistema usa un transductor ultrasónico conectado a un nebulizador para producir una neblina con la solución de nutrientes. Dicha solución se libera en el interior del biorreactor por un flujo de aire. Con el empleo de métodos ingenieriles para análisis cuantitativos, se estudia el crecimiento y el consumo de azúcares.

Los autores han determinado la dinámica de crecimiento de *Dianthus caryophyllus* en dicho diseño y refieren que los brotes presentan una morfología normal y no se presentaron síntomas de hiperhidricidad. Por el contrario los cultivos en medio líquido presentan rasgos severos de este desorden fisiológico.

En el caso de suspensiones celulares, Nagai (1994) ha desarrollado un biorreactor que minimiza el estrés físico de las células debido a la agitación del medio de cultivo por un impelente. El diseño ha recibido el nombre de biorreactor de soporte fijo. La minimización del estrés viene dada por la división del reactor en dos partes: área de agitación y área de cultivo. El medio es aireado en el fondo del biorreactor por tubos de acero con huecos pequeños y es mezclado por un impelente de 12 cuchillas. El impelente mueve el medio hacia abajo por el centro y hacia arriba por la periferia del reactor. Las células cultivadas nunca se ponen en contacto con el impelente sino que crecen firmemente sujetas a una red de acero que se encuentra en el centro de la bomba de la turbina. En experimentos con suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*), el autor encontró que los coeficientes de proliferación fueron semejantes a los obtenidos en *erlenmeyers*.

Otro grupo de biorreactores se ha denominado sistemas de inmersión temporal. Robacker y Simonton (1992) describieron un aparato para el cultivo en medio líquido de *Amelanchier x grandiflora* con el uso de una computadora que variaba la exposición de los explantes al medio. Los explantes permanecían en una plataforma perforada que se encontraba fija en el fondo del recipiente de cultivo. El medio era bombeado hacia el contenedor de plantas y

extraído de acuerdo con un cronograma preestablecido. Los autores señalaron la obtención de una alta proliferación cuando los cultivos se mantuvieron continuamente en contacto con el medio en las etapas iniciales y esto se redujo con el cursar del ciclo del cultivo.

Akita y Takayama (1994) han descrito una técnica para la producción de tubérculos de papa en biorreactores. Ellos encontraron que cuando se cultivan 100 segmentos nodales en un fermentador *airlift* de 10 litros, los tubérculos se forman en la interfase aire-líquido del medio de cultivo. El crecimiento y la tuberización se inhibieron en los explantes sumergidos permanentemente. Con el objetivo de reducir la inmersión constante, se conectó el fermentador a un recipiente reservorio de medio de cultivo y se bombeó todo el medio desde este recipiente hasta el de las plantas con una frecuencia de seis horas. El tiempo de inmersión fue de una hora. Con el nuevo método se logró la tuberización en todas las plantas del biorreactor.

Alvard *et al.* (1993) describieron un sistema de inmersión temporal que usa unidades de filtración en la que los explantes se cultivan en la parte superior y una bomba de vacío provoca la inmersión de los explantes. El sistema se ha usado exitosamente en un gran número de especies de plantas. La velocidad y calidad del desarrollo vegetal en los sistemas de inmersión temporal, son generalmente superiores a los obtenidos con el medio líquido o semi-sólido tradicionales. A su vez, el endurecimiento se mejora después de la transferencia de las plantas para la fase de aclimatización.

En el caso del cultivo de embriones, se puede controlar su desarrollo y la hiperhidricidad mediante la variación de la frecuencia y duración de las inmersiones. La multiplicación óptima de embriones de café se logra con la inmersión de los cultivos por 15 min. cuatro veces al día. Inmersiones más prolongadas resultan en la hiperhidricidad. Por otra parte, las más cortas son menos eficientes. Una simple inmersión de un minuto por día permite el cultivo continuado pero impide el desarrollo de los embriones. Por lo tanto, el control de los tiempos de inmersión puede usarse para regular las fases de la embriogénesis. El sistema se ha usado con frecuencias tan bajas como un minuto semanal (Teisson y Alvard, 1995).

De acuerdo con los autores, la técnica se empleará a escala comercial para el café y describieron el sistema de inmersión temporal como una nueva herramienta para controlar las reacciones *in vitro* de las plantas. Declararon además, que más de 200 unidades se usan en otros laboratorios y que pueden reemplazar los costosos biofermentadores tanto para la investigación como la producción masiva de plantas.

La técnica de inmersión temporal se ha empleado exitosamente en Cuba para la micropropagación de la piña (Escalona *et al.*, 1999), para la embriogénesis somática del banano (Gómez *et al.*, 1999; citados por Herman, 1999), y para la producción de microtubérculos de papa (Jiménez *et al.*, 2000). En el primer caso, las plantas derivadas de sistemas de inmersión temporal presentaron un mayor crecimiento y desarrollo en las condiciones *ex vitro* en comparación con las plantas provenientes de la micropropagación convencional. Los costos de producción de vitroplantas de piña se redujeron en un 66.7%.

Como se ha señalado anteriormente, la frecuencia de inmersión constituye uno de los factores que debe optimizarse durante el establecimiento de un protocolo con el uso de esta técnica (Alvard *et al.*, 1993; Escalona *et al.* 1999). Mediante su manejo se puede regular la respuesta morfogénica de las plantas. Sin embargo, en ocasiones resulta imprescindible el estudio de la proporción explantes:volumen de medio de cultivo. Escalona *et al.* (1999) determinaron el efecto de esta relación en la micropropagación de la piña. Estos autores concluyeron que 1000 mL de medio de cultivo para nutrir a cinco explantes promueven marcadamente la proliferación. Valores por encima o por debajo son ineficientes y reducen significativamente la masa fresca y el coeficiente de multiplicación.

El uso de retardantes del crecimiento constituye una de las estrategias más usadas actualmente para evitar la hiperhidricidad que es un inconveniente fundamental del cultivo en medio líquido. Dichos retardantes han tenido un amplio uso en la agricultura y en la horticultura ornamental para el control del crecimiento (Aron *et al.*, 1985; Beausher y Yelenosky, 1987; Douglas y Keever, 1988; Early y Martin, 1986; Steffens y Zimmerman, 1990; Wei y Cheng, 1995; Zimmerman y Steffens, 1995), la germinación de semillas (Salomon, 1986; Beausher y Yelenosky, 1987), la reducción del número y longitud de las raíces laterales (Early y Martin, 1986; Salomon, 1986; Beausher y Yelenosky, 1987); así como, en la inducción de la floración y en el control del tamaño y la calidad de los frutos (Monselise, 1986).

Ziv y Ariel (1991) han usado los retardantes del crecimiento como el paclobutrazol o el ancimidol en medio líquido con agitación o en biorreactores para micropropagar *Philodendron*. El tratamiento corto y transitorio de los explantes con dichos reguladores del crecimiento, inhibió el desarrollo de las hojas e indujo la formación de agregados de yemas. Aunque los retardantes tienen cierto efecto enanizante en el medio de endurecimiento semi-sólido, las plantas regeneradas a partir de estos cultivos reinician su crecimiento normal después de 3-6 semanas de aclimatización.

El paclobutrazol es un compuesto triazólico, inhibidor de la síntesis de giberelinas (Hedden y Graebe, 1985; Grossman, 1990). Los efectos de este retardante sobre el metabolismo de las plantas incluyen la biosíntesis de esteroides, ácido abscísico y citoquininas (Pinhero y Fletcher, 1994). La figura 1 resume los efectos del paclobutrazol.

Este compuesto ha incrementado la proliferación de las yemas e inducido la producción de cormos en el cultivo *in vitro* de gladiolos (*Gladiolus sp.*) (Ziv, 1989, 1990). La adición del paclobutrazol al medio de cultivo, incrementó el porcentaje de regeneración de nuevas yemas en los segmentos internodales de *Solanum tuberosum* (Opatrna *et al.*, 1997). El efecto positivo del retardante sobre la regeneración se atribuye a su interacción con el metabolismo de las citoquininas. Werbrouck y Debergh (1995) también señalaron una fuerte relación sinérgica entre algunos fungicidas imidazólicos, similares estructuralmente al paclobutrazol, y la aplicación exógena de citoquininas.

Figura 1

El paclobutrazol y el ancimidol reducen la elongación de los brotes y el área foliar. El primero incrementa además el contenido de cloroplastos y mejora la resistencia al estrés (Ziv, 1995). También se ha encontrado que el paclobutrazol aumenta la tolerancia a la desecación

en plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*), rosa (*Rosa sp.*) y uva (*Vitis sp.*) provenientes de la micropropagación (Smith *et al.*, 1990; Ritchie *et al.*, 1991). La barrera a la desecación está asociada con el aumento en el contenido de cera, al mejoramiento del control estomático y al engrosamiento de las raíces (Roberts *et al.*, 1992). Sankhla *et al.* (1993) señalan que las giberelinas reducen la formación de brotes de *Albizia julibrissin* y que un efecto contrario lo provocan los inhibidores de su síntesis. Algo semejante ocurre en la formación de cormos de gladiolos (Steinitz y Kipnis, 1989).

En piña, Escalona *et al.* (1995) y Daquinta (1998) han utilizado el paclobutrazol para incrementar la proliferación. El primer grupo de investigadores ha señalado el efecto positivo de la combinación del paclobutrazol con la inmersión temporal para incrementar la proliferación (Escalona *et al.*, 1999).

2.3. Cambio del contenido de fenoles durante la micropropagación.

El metabolismo secundario incluye una gran gama de compuestos de utilidad para la medicina, la alimentación y la producción de cosméticos. El cultivo *in vitro* se ha usado frecuentemente para estimular su formación. Como ejemplo pueden mencionarse la obtención de artemisina en biorreactores para la proliferación de brotes de *Artemisa annua* (Liu *et al.*, 1998); taninos bioactivos en cultivos de callo de *Oenothera laciniata* (Taniguchi *et al.*, 1998); taxol en líneas celulares de *Taxus wallichiana* (Jha *et al.*, 1998); forskolina en cultivos de raíces de *Coleus forskohlii* (Sasaki, 1998); y escopolamina a partir de cultivos de raíces de *Hyoscyamus muticus* Cairo (Jouhikainen *et al.*, 1999).

Existe cierta relación entre la proliferación *in vitro* y la producción de metabolitos secundarios. Sakuta y Komamine (1987) analizaron dicha conexión en suspensiones celulares y propusieron dos patrones:

1 Producción de metabolitos secundarios durante la fase estacionaria del crecimiento de la suspensión. Esta producción está asociada a la diferenciación celular, como se ha visto en la acumulación de antocianina en cultivos de *Daucus carota* (figura 2 a).

2 Producción de metabolitos secundarios durante la fase logarítmica del crecimiento de la suspensión. Dicha producción está asociada con la división celular indiferenciada, como se ha visto en la acumulación de betacianina en cultivos de *Phytolacca americana* (figura 2 b).

El patrón 1 es el más frecuentemente observado, como se ha encontrado en la producción de fenoles en cultivos de *Acer pseudoplatanus* (Phillips y Henshaw, 1977) y otros. Los patrones anteriores tienen una gran importancia para determinar el momento óptimo para la “cosecha” de los metabolitos. Sin embargo, su formación está íntimamente relacionada con complejos procesos fisiológicos que tienen lugar en las células vegetales. Como ya se ha mencionado, los fenoles también forman parte del metabolismo secundario y en ellos se centrará la atención del presente acápite.

Figura 2

Las plantas con flores, los helechos, los musgos y muchos microorganismos contienen diversos tipos y cantidades de fenoles. Con importantes excepciones, se desconocen las funciones de la mayoría de estos compuestos. Todos poseen un anillo aromático al que se unen diversos grupos sustituyentes, como hidroxilo, carboxilo; y a menudo otras estructuras cíclicas no aromáticas (Salisbury y Ross, 1992).

Existen muchos compuestos fenólicos que surgen de la ruta del ácido shiquímico y de reacciones subsecuentes. Entre ellos están los ácidos cinámico, p-cumárico, cafeico, ferúlico, protocatecuico y gálico (Hahlbrock y Scheel, 1989). En la figura 3 aparece la ruta metabólica que relaciona los ácidos mencionados.

La enzima polifenoloxidasas dependiente del cobre cataliza la oxidación de los fenoles para producir quinonas que rápidamente se polimerizan para formar compuestos de estructura indefinida (Butt y Lamb, 1981; Mayer, 1987). Esta es una de las reacciones más importantes cuya modulación ocupa a una buena parte de los investigadores del cultivo de tejidos de plantas.

Los ácidos fenólicos son intermediarios del metabolismo fenilpropanoide (Cvikrová *et al.*, 1996). Son precursores de la síntesis de lignina (Lewis y Yamamoto, 1990) y fitoalexinas fenilpropanoides (Kessmann *et al.*, 1990). Su deposición en las paredes celulares después de la infección de un patógeno es un mecanismo de defensa importante (Bolwell *et al.*, 1985). Se conoce que los fenoles están involucrados en la regulación del crecimiento (Marigo y Boudet, 1979) y en el proceso de diferenciación y organogénesis (Beaudoin–Eagan y Thorpe, 1984;

Figura 3

Mato *et al.*, 1988). Sus niveles se afectan por un amplio espectro de factores externos e internos donde se incluyen los reguladores del crecimiento (Zaprometov, 1989).

Cvikrová *et al.* (1996) formaron callos de alfalfa en un medio con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. Los autores determinaron las variaciones de los fenoles libres, los ésteres solubles, los glicósidos solubles, y los ésteres formados con la pared celular. Encontraron que el contenido total de fenoles disminuyó durante los primeros tres días de cultivo en la fase de inducción de la embriogénesis y continuó el decremento en la fase de máxima división celular. Sin embargo, el contenido relativo de los cuatro grupos de fenoles no

fue el mismo. La concentración de fenoles solubles fue relativamente superior que la de aquellos unidos a la pared celular. La división celular es precedida por la desdiferenciación y desorganización de los tejidos del explante. Este proceso incluye cambios de las posiciones de las células individuales (Yoshida y Komae, 1992). Las variaciones en las propiedades mecánicas de la pared, implican el rompimiento de algunos enlaces iónicos y covalentes entre los diferentes constituyentes (Fry, 1988). El decremento de los fenoles unidos a la pared puede ser el resultado de este proceso (Cvikrová *et al.*, 1996).

Chirek (1990) cultivó suspensiones celulares de tabaco y determinó que el contenido más alto de fenoles aparece en las células antes de la mitosis. La reducción coincidió con el comienzo del crecimiento intensivo. En el caso de la organogénesis, también se ha encontrado que un bajo contenido de fenoles eleva la formación de brotes de *Cichorium intybus* (Legrand y Bouazza, 1991). Los fenoles inhiben la actividad de la enzima ácido indolacético oxidasa (Grambow y Langenbeck-Schwich, 1983; Pedreño *et al.*, 1990; Cvikrová *et al.*, 1996) ya que posiblemente actúan como protectores de las auxinas (Mato *et al.*, 1988).

Beruto *et al.* (1996) señalan que los callos de *Ranunculus asiaticus* L. sin capacidad para regenerar se caracterizaron por un alto contenido de polímeros fenólicos y una elevada actividad de las peroxidasas y la polifenoloxidasa. Hrubcová *et al.* (1994) obtuvieron un resultado semejante. Los autores estudiaron suspensiones embriogénicas y no embriogénicas de alfalfa. Los cultivos no embriogénicos proliferaron más y su producción de fenoles fue significativamente superior.

En las citas anteriores, el consenso general de los autores parece indicar un efecto negativo de los fenoles en los procesos de regeneración *in vitro*. Sin embargo, otro grupo de investigadores ha señalado opiniones diferentes.

Compton y Preece (1988b) señalan que los fenoles no son necesariamente dañinos para los cultivos y realmente pueden promover la proliferación. Estos autores usaron catecol y floroglucinol para el cultivo de callos y la formación de brotes de zarzamora (*Rubus spp.*). Los fenoles mencionados no influyeron en el crecimiento de los callos pero estimularon la brotación. Por otra parte, Jokinen *et al.* (1988; citados por Herman, 1991) señalan la existencia de cierta correlación positiva entre los altos niveles de ácido shiquímico y la formación de yemas de *Pinus sylvestris*. Los bajos niveles de este ácido se asociaron con baja actividad metabólica y envejecimiento de los cultivos *in vitro*.

El papel de los compuestos fenólicos en el cultivo del pino (*Pinus sp.*) y posiblemente en otras plantas no sea simplemente un indicador de pobre crecimiento, envejecimiento o muerte, sino una causa o resultado del crecimiento vigoroso (Herman, 1991). Wolf *et al.* (1976) indican una posición intermedia al analizar sus resultados relacionados con el efecto de diferentes fenoles en el cultivo de la avena. Ellos señalan que los monofenoles estimulan la oxidación del ácido indolacético mientras los difenoles y polifenoles son protectores de esta auxina. Este papel negativo de los monofenoles también fue señalado por Gaspar y Hofinger (1988).

En los dos últimos acápite de la revisión bibliográfica se han reseñado brevemente el estado actual de algunos factores que influyen en la proliferación *in vitro*. Dichos factores han sido: el efecto del sistema de cultivo; la relación número de explantes:volumen de medio; la frecuencia de inmersión; y el uso de inhibidores del crecimiento. Los mismos no han sido estudiados en la caña de azúcar en las condiciones de la inmersión temporal por lo que constituyen el primer objetivo de este trabajo.

Por otra parte, se ha hecho referencia a algunas consideraciones sobre la relación entre los fenoles y la micropropagación de plantas. Los fenoles producidos por los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar y su relación con la proliferación de esta especie en sistemas de inmersión temporal, no han sido estudiados y es precisamente un aspecto sobre el que se pretende realizar una contribución como segundo objetivo del presente trabajo de tesis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.0 Generalidades sobre los experimentos y tratamiento estadístico de los datos.

Esta investigación se desarrolló en el Centro de Bioplantitas (Universidad de Ciego de Avila) y en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Ciego de Avila. Durante su ejecución se realizaron varios experimentos clasificados como monofactoriales con dos niveles o más y con un diseño completamente aleatorizado excepto en el estudio en campo en que se utilizó un diseño de bloques al azar. Se cumplió el principio de la diferencia única siempre que fue posible. Esto significa que la única diferencia entre los tratamientos eran los factores que se evaluaban. En la mayoría de los casos, el mejor resultado de un experimento sirvió como premisa para el que le siguió.

Por el tipo de variables estudiadas, generalmente no se encontraron ajustes a la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov) ni homogeneidad entre las varianzas de cada uno de los tratamientos (Bartlett). Por ello se decidió hacer pruebas no paramétricas. Tal como su nombre lo indica, estas pruebas no requieren del cumplimiento de los dos parámetros mencionados: distribución normal y homogeneidad de varianzas.

En el caso de los experimentos monofactoriales con dos niveles solamente, se realizó la prueba Mann-Whitney. Para los experimentos monofactoriales con más de dos niveles, se realizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias entre las medias de todos los tratamientos. En caso positivo, dicha prueba se siguió por Student-Newman-Keuls para determinar los grupos homogéneos. En todos los casos, se trabajó con un valor de probabilidad de cometer error de tipo I de $p < 0.05$.

En el caso de los experimentos de aclimatización y crecimiento en campo, se realizaron análisis paramétricos: Prueba t de Student, Análisis de Varianza y Pruebas Duncan. El tipo de procesamiento hecho en cada caso aparece reflejado en las tablas y figuras del acápite de resultados y discusión.

En algunos acápites se realizaron análisis de regresión lineal (acápites 4.2.5) o de segundo grado (acápites 4.1.2; 4.1.3; 4.1.4; 4.1.5). En los casos de ecuaciones de segundo grado, se calcularon los óptimos matemáticos y se siguieron los pasos siguientes: determinación de la

primera derivada, y despeje de x cuando $y' = 0$. Para determinar que los valores del coeficiente de correlación eran significativamente diferentes de cero, también se utilizó un valor de $p < 0.05$. En todos los casos se empleó el utilitario *Complete Statistical System (CSS/3A Copyright © Stat soft, INC, 1991)*.

Toda la investigación se realizó con la variedad C-1051-73. Sin embargo, los acápites 3.1.10 y 4.1.10 recogen una comparación entre cultivares. En todos los experimentos se trabajó con material libre del virus del mosaico de la caña de azúcar, el virus baciliforme, la escaldadura, la gomosis y el raquitismo de los retoños según la metodología propuesta por Peralta *et al.* (1997). Dicho diagnóstico se realizó en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La esterilización de todos los medios de cultivo se realizó en autoclave (121 °C; 1.2 kg. cm⁻²; 15 minutos) excepto en el acápite 3.2.3 en el que el ácido gálico y el ácido indolacético se filtraron (diámetro del poro: 0.22 μm).

3.1 Primera parte: Desarrollo del nuevo protocolo para la formación de brotes de calidad de caña de azúcar mediante el uso de la inmersión temporal y el manejo de diferentes condiciones experimentales.

3.1.1. Comparación de tres métodos de micropropagación: medio semi-sólido, medio líquido e inmersión temporal.

Se cultivaron meristemas de plantas procedentes de campo de acuerdo con el protocolo de Jiménez (1995). Posteriormente, los brotes derivados de los meristemas se cultivaron en frascos convencionales para la micropropagación (300 mL de capacidad, vidrio, 25 mL de

medio de cultivo por frasco, 5 brotes por frasco). El medio incluyó las sales de Murashige y Skoog (1962), las vitaminas de Heinz y Mee (1969), 100 mg/L de mioinositol, 30 g/L de sacarosa y 0.3 mg/L de benziladenina y se utilizaron brotes con cuatro subcultivos (4 cm de longitud aproximadamente). Brotes con tales características se usaron en todos los experimentos de esta tesis.

Se compararon tres procedimientos de micropropagación: medio de cultivo semi-sólido (2,5 g/L de gelrite), y medio de cultivo líquido según Jiménez (1995); y sistema de inmersión temporal (ver figura 4 y tabla 1). En este experimento se utilizaron como testigo los procedimientos de Jiménez (1995) por ser los que se emplean actualmente en las biofábricas cubanas. El diseño del sistema de inmersión temporal corresponde al recomendado por Escalona *et al.* (1999) para la micropropagación de la piña.

Figura 4

Cada tratamiento se repitió tres veces. Los cultivos se mantuvieron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz fluorescente) y un fotoperíodo de 16 horas de luz-8 horas de oscuridad. Se evaluó el número de brotes (mayores de 0.5 cm) por explante, la altura de los brotes desde la base hasta el extremo de las hojas, y la masa fresca de los brotes. Dichas evaluaciones se realizaron a los 30 días de cultivo según recomienda Jiménez (1995).

3.1.2. Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.

Se estudiaron diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante. Los tratamientos fueron: 5.0 (utilizado en el experimento anterior); 27.5; 50.0; 72.5 y 95 mL. La selección de estas variantes experimentales respondió a los resultados obtenidos en un experimento

preliminar cuyos resultados no están incluidos en este documento. Los sistemas de inmersión empleados correspondieron con el que aparece en la figura 4b. Solamente se incrementó la capacidad del recipiente de medio de cultivo E (hasta 500 mL) y se reguló la longitud del tubo de silicona (D) para lograr que como máximo pasaran 280 mL al frasco de plantas. Las condiciones de inmersión temporal se describieron anteriormente. La tabla 2 resume los tratamientos. El número de brotes por explante, la altura de los brotes y su masa fresca se evaluaron después de 30 días de cultivo. Cada tratamiento se repitió tres veces.

3.1.3. Efecto de la frecuencia de inmersión en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.

Se utilizaron 50 mL de medio de cultivo por explante en todos los tratamientos (mejor

Tablas 1 y 2

resultado en experimento anterior). Se evaluaron diferentes frecuencias de inmersión: 1, 2, 4, 8 (empleado en los experimentos anteriores) y 12 inmersiones por día. Para la selección de los tratamientos se tuvieron en cuenta los trabajos de Teisson y Alvard (1995), Etienne *et al.* (1997), y Escalona *et al.* (1999) quienes han utilizado estas frecuencias para la micropropagación del café, el caucho y la piña, respectivamente. Los sistemas de inmersión fueron los mismos que se usaron en el experimento anterior. Las condiciones de inmersión temporal se describieron anteriormente. La tabla 3 resume los tratamientos. El número de brotes por explante, la altura y la masa fresca de los brotes se evaluaron después de 30 días de cultivo. Cada tratamiento se repitió tres veces.

3.1.4. Efecto de la adición de paclobutrazol al medio de cultivo en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.

Como premisa se utilizó 50 mL de medio de cultivo por explante y 8 inmersiones por día (mejor resultado del experimento anterior). Se evaluaron las concentraciones de paclobutrazol siguientes: 0.0; 0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 mg/L como suplemento al medio de cultivo descrito anteriormente. La tabla 4 resume los tratamientos que tuvieron como precedentes los trabajos de Ziv (1989, 1990), Roberts *et al.* (1992), Opatrna *et al.* (1997), y Escalona *et al.* (1999). Las condiciones de cultivo se mencionaron en los experimentos precedentes. El número de brotes por explante, la altura y la masa fresca de los brotes se evaluaron después de 30 días de cultivo. Cada tratamiento se repitió tres veces.

Tablas 3 y 4

3.1.5. Efecto del ácido giberélico después de la formación de brotes con paclobutrazol en sistemas de inmersión temporal.

Primeramente se desarrolló la etapa de formación de brotes en sistemas de inmersión temporal como se ha descrito anteriormente. Se utilizaron 50 mL de medio de cultivo por explante inicial, 8 inmersiones por día, y 1.0 mg/L de paclobutrazol (mejor resultado del experimento anterior). Después de 30 días de cultivo se cambió el frasco de medio de cultivo por otro que contenía el medio de Murashige y Skoog (1962) con diferentes concentraciones de

ácido giberélico. Los brotes y los frascos no se lavaron durante dicho cambio. Los tratamientos fueron: 0.0; 0.5; 1.0; y 1.5 mg/L. La tabla 5 resume los tratamientos que tuvieron como precedente el trabajo de Escalona *et al.* (1999) quienes utilizaron el ácido giberélico para el alargamiento de brotes de piña después de la aplicación de paclobutrazol. Las condiciones de cultivo se describieron anteriormente. La altura y la masa fresca de los brotes se evaluaron después de 15 días de cultivo. Cada tratamiento se repitió tres veces.

3.1.6. Comparación entre las plantas obtenidas en la micropropagación convencional y en la inmersión temporal durante la fase de enraizamiento.

Para la ejecución de este experimento se obtuvieron brotes mediante el protocolo de micropropagación convencional en medio líquido y en sistemas de inmersión temporal según las mejores condiciones determinadas en los experimentos precedentes. La tabla 6 muestra los tratamientos. Los brotes se individualizaron después de la fase de proliferación y se colocaron en el medio de enraizamiento recomendado por Jiménez (1995): sales de Murashige y Skoog (1962), 1.3 mg/L de ácido indolacético y 4% (p:v) de sacarosa. No se realizó ningún lavado de

Tabla 5

Tabla 6

los explantes durante dicha transferencia. Este experimento se realizó en los frascos convencionales utilizados en la micropropagación de la caña de azúcar. Cada frasco contuvo 50 mL de medio de cultivo para nutrir a 10 brotes. Los tratamientos contaron con 10 repeticiones de 10 brotes cada una. A los 15 días se evaluó el porcentaje de brotes con raíces, la longitud de las raíces y el número de raíces por brote.

3.1.7. Comparación entre las plantas obtenidas en la micropropagación convencional y en la inmersión temporal durante la fase de aclimatización.

Se obtuvieron brotes mediante el protocolo de micropropagación convencional en medio líquido y en sistemas de inmersión temporal. La tabla 6 muestra los tratamientos. Dichos

brotos se enraizaron de la forma descrita anteriormente. A los 15 días de enraizamiento, ambos grupos de plantas se transfirieron para el área de aclimatización y se aplicó el procedimiento recomendado por Rodríguez *et al.* (2000). Se utilizó como sustrato una mezcla de cachaza: ceniza (1:1, en volumen). Los primeros 21 días, las plantas estuvieron con 90% de humedad relativa y $433 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como densidad de flujo de fotones fotosintéticos. Posteriormente, se disminuyó la humedad relativa hasta 80% y se incrementó el flujo de fotones fotosintéticos hasta $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se aplicó riego microjet automatizado durante dos minutos cada 28 min. Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones de 10 plantas. Al cabo de 42 días se evaluó el porcentaje de supervivencia y la masa fresca de las plantas. El experimento se desarrolló en bandejas plásticas de 144 capacidades. Las dimensiones de cada una de ellas fueron: 2.7 cm de diámetro superior, 1.7 cm de diámetro inferior y 3.7 cm de profundidad.

3.1.8. Comparación entre las plantas de inmersión temporal con testigos de la micropropagación convencional y de propagación vegetativa durante el crecimiento en campo.

Se obtuvieron brotes mediante el protocolo de inmersión temporal desarrollado en esta tesis y el convencional propuesto por Jiménez (1995) (tabla 6). Ambos grupos de brotes se enraizaron según Jiménez (1995) y aclimatizaron de la forma descrita por Rodríguez *et al.* (2000). Las vitroplantas se compararon con un testigo de la propagación vegetativa (plantas obtenidas de yemas aisladas de campo según Espinosa *et al.* (1997)).

Para el aislamiento de las yemas se usó una sierra de doble disco. Las yemas aisladas se colocaron en un pregerminador rústico donde se taparon con sacos de yute y *nylon* para

aumentar la temperatura. Posteriormente se mantuvieron en invernadero por 60 días. Se estableció un experimento en campo (febrero, 1997) con un diseño bloque al azar con cuatro réplicas por tratamiento. Las parcelas tenían 7.5 m de largo y 5 surcos cada una. Los tratamientos se plantaron a una distancia de 0.5 m entre plantas. La variedad C-266-70 se plantó en los bordes. Se aplicó fórmula completa en la plantación (75 kg/ha de nitrógeno; 50 kg/ha de P_2O_5 y 50 kg/ha de K_2O). Se aplicaron además, 75 kg/ha de nitrógeno a los tres meses de la plantación (Servicio de Recomendación de Fertilización del Ministerio del Azúcar).

Se realizaron las evaluaciones siguientes: longitud de los tallos (3 meses); longitud y diámetro de los tallos (6 meses); y yemas por tallo, masa de los tallos, diámetro de los tallos, longitud de los tallos y tallos por plantón (9 meses). La cepa planta se cortó después de 9 meses de crecimiento en campo y los pasos posteriores se recogen en la figura 5. En el caso del aislamiento de yemas se procedió de la misma forma descrita anteriormente.

Figura 5

3.1.9. Comparación de los costos de producción de las fases de formación de brotes en la micropropagación convencional y en sistemas de inmersión temporal.

Los protocolos que se compararon fueron: medio líquido y medio semi-sólido según Jiménez (1995); y el de inmersión temporal desarrollado en este trabajo. Se tuvieron en cuenta los costos diferenciales de los tres procesos: materiales directos, salario directo, depreciación y gastos indirectos.

3.1.10. Evaluación del protocolo de micropropagación en sistemas de inmersión temporal con otras variedades.

El protocolo establecido en los experimentos anteriores se evaluó con diferentes variedades (C- 91-301; C-120-78; C-323-68; C-85-212; CP-52-43; C-85-214). Se incluyó un testigo con C-1051-73. Se utilizaron 50 mL de medio por explante inicial, 8 inmersiones por día, y 1.0 mg/L de paclobutrazol. Cada variedad incluyó un testigo cultivado según Jiménez (1995). La tabla 6 resume los tratamientos que se repitieron tres veces para cada variedad. El número de brotes por explante se evaluó después de 30 días de cultivo. Se realizó también la fase de alargamiento en sistemas de inmersión temporal con 1.0 mg/L de ácido giberélico. La altura de los brotes se evaluó a los 15 días.

3.2 Segunda parte: Evaluación de algunos aspectos de la relación entre la producción de fenoles y el proceso de formación de brotes de caña de azúcar.

3.2.1. Cambios de la proliferación y del contenido de fenoles en el medio de cultivo durante la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.

Quince sistemas de inmersión temporal se establecieron al inicio de este experimento. Los explantes se obtuvieron de la forma descrita anteriormente. Se usaron 50 mL de medio de cultivo por explante inicial, 8 inmersiones por día, y 1.0 mg/L de paclobutrazol. Estas condiciones fueron las determinadas en la primera parte de esta tesis.

Cada 10 días de cultivo y hasta los 40, se colectaron tres sistemas para evaluarles: masa fresca, masa seca, número de brotes y excreción de fenoles al medio. La masa seca se obtuvo mediante el secado de los brotes a 60⁰C hasta masa constante. La excreción de fenoles se determinó con el procedimiento modificado de Hoagland (1990). El medio de cultivo (0.5

mL) se mezcló con 4.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de Folin Ciocalteau (50% v/v). La mezcla se agitó y se dejó reposar por 5 min. Se añadió 1.0 mL de solución saturada de carbonato de sodio. La mezcla se agitó nuevamente y se dejó reposar durante 60 min. Entonces se leyó la densidad óptica a 725 nm. La concentración de fenoles se determinó con una curva de ácido gálico. La evaporación y consumo del medio de cultivo se tomó como factor de corrección del contenido de fenoles.

La composición de los fenoles en el medio de cultivo después de 20 días de proliferación se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (Pharmacia LKB . HPLC Column Oven 2155). Se utilizó una columna (C-18) de fase reversa con tamaño de partícula de 5 μm y 125-4 mm. La detección se realizó a 254 nm. El lazo de inyección fue a volumen fijo (20 μL). El sistema de solventes consistió en metanol (15%) y acetato de sodio (85%, 0.05 mol/L) a pH 4.7, a gradiente continuo por 30 min. y una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. Se utilizaron patrones de ácido gálico, ácido p-cumárico y ácido cafeico (1.0 mg/L). La selección de estos patrones tuvo como precedente otros experimentos preliminares no recogidos en este documento.

3.2.2. Efecto del subcultivo con medio fresco en la proliferación en sistemas de inmersión temporal.

Para comparar el efecto del suministro frecuente de nutrientes y la eliminación de fenoles y probablemente de otros productos de excreción, se compararon dos tratamientos: sistemas de inmersión temporal subcultivados con medio fresco cada 10 días, y sistemas de inmersión

temporal no subcultivados como se desarrolla normalmente. La tabla 7 resume los tratamientos.

Cada tratamiento contó con quince sistemas. Con una periodicidad de 10 días se realizaron las evaluaciones que incluyeron tres sistemas por tratamiento. Se registraron: la masa fresca, la masa seca y el número de brotes por sistema de inmersión temporal. Las condiciones del experimento se han descrito en los acápites anteriores.

3.2.3. Efecto del ácido indolacético y el ácido gálico en la proliferación en sistemas de inmersión temporal.

En este experimento se compararon cuatro tratamientos:

- Sistemas de inmersión temporal subcultivados con medio fresco a los 10 días de iniciado el cultivo.

Tabla 7

- Sistemas de inmersión temporal subcultivados con medio fresco con 1.6 mg/L de ácido gálico a los 10 días de iniciado el cultivo.
- Sistemas de inmersión temporal subcultivados con medio fresco con 1.6 mg/L de ácido indolacético a los 10 días de iniciado el cultivo.
- Sistemas de inmersión temporal no subcultivados a los 10 días de iniciado el cultivo.

La tabla 8 resume los tratamientos. La concentración de ácido gálico empleada (1.6 mg/L) corresponde al contenido de fenoles detectado a los 10 días en los acápite 3.2.1 y 4.2.1. Las masas molares del ácido gálico y del ácido indolacético son muy parecidas por lo que para ambos $1.6 \text{ mg/L} \approx 9.4 \text{ } \mu\text{mol/L}$. El uso de estos dos compuestos tuvo como precedente el planteamiento de varios investigadores que han relacionado el metabolismo fenólico con el del

ácido indolacético (Wolf *et al.*, 1976; Grambow y Langenbeck-Schwich, 1983; Gaspar y Hofinger, 1988; Mato *et al.*, 1988; Pedreño *et al.*, 1990; Cvikrová *et al.* 1996). Cada tratamiento se replicó tres veces. A los 20 días de iniciado el experimento (10 días después del subcultivo) se evaluó el número de brotes por sistema de inmersión temporal.

3.2.4. Efecto de la cisteína en la proliferación y el contenido de fenoles en el medio de cultivo durante la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.

Diferentes concentraciones de cisteína (0, 20, 40, 60 y 80 mg/L) se evaluaron como suplementos al medio de cultivo para la formación de brotes en sistemas de inmersión temporal. Las concentraciones usadas tuvieron como precedente el trabajo de Richard *et al.* (1992). Se usaron 50 mL de medio de cultivo por explante inicial, 8 inmersiones por día, y 1.0 mg/L de

Tabla 8

paclobutrazol. La tabla 9 resume los tratamientos. Cada concentración de cisteína se repitió tres veces y las condiciones experimentales fueron descritas anteriormente. La presencia de fenoles en el medio de cultivo se determinó después de 20 días de proliferación. Se siguió el procedimiento modificado de Hoagland (1990) como se ha señalado con anterioridad. El número de brotes y la masa fresca por sistema de inmersión temporal se evaluaron a los 30 días de cultivo. En ese mismo momento, se registró la altura y masa fresca individual de los brotes.

3.2.5. Efecto de la inmersión temporal, el incremento del volumen de medio de cultivo por explante, y el paclobutrazol en la formación de brotes y la producción de fenoles.

En este experimento se compararon los tratamientos más importantes que produjeron el incremento de la proliferación de caña de azúcar. Ellos fueron:

- Medio líquido en frascos convencionales (ver primer experimento).
- Sistema de inmersión temporal con 5.0 mL de medio de cultivo por explante inicial (ver primer experimento).
- Sistemas de inmersión temporal con 50.0 mL de medio por explante inicial (ver segundo experimento).
- Sistemas de inmersión temporal con 50 mL de medio por explante inicial y 1.0 mg/L de paclobutrazol (ver cuarto experimento).

La tabla 10 resume los tratamientos. La presencia de fenoles en el medio de cultivo se determinó después de 20 días de proliferación. Se empleó el procedimiento modificado de Hoagland (1990) como se ha descrito anteriormente. El número de brotes por frasco de cultivo se evaluó a los 30 días. Cada tratamiento se repitió tres veces y las condiciones experimentales fueron señaladas con anterioridad.

Tabla 9

Tabla 10

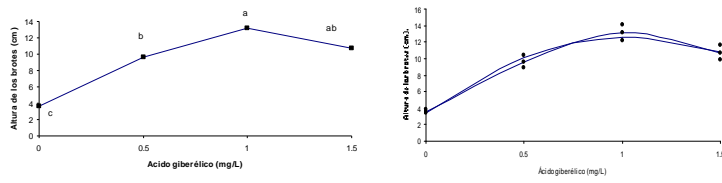


Figura 18: Efecto del ácido giberélico en la altura de los brotes en sistemas de inmersión temporal después de 15 días de alargamiento. Izquierda: Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, Media general=9.28 cm, ET=0.71 cm). Derecha: ecuación $y = 3.42 + 17.56x - 8.40x^2$; $r^2 = 0.96$; $n = 12$.

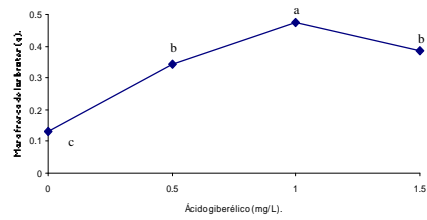


Figura 19: Efecto del ácido giberélico en la masa fresca de los brotes en sistemas de inmersión temporal después de 15 días de alargamiento. Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, Media general=0.333 g, ET=0.025 g).

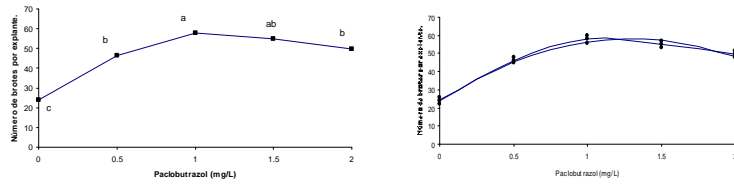


Figura 15: Efecto del paclitaxel en la formación de brotes en sistemas de inmersión temporal después de 30 días de cultivo. Izquierda: Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, Media general=46.53 brotes por explante, ET=1.78 brotes por explante). Derecha: ecuación $y = 24.4 + 51.80x - 19.90x^2$; $r^2 = 0.96$; $n = 15$.

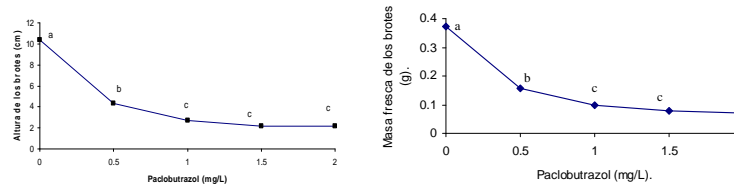


Figura 16: Efecto del paclitaxel en la altura de los brotes formados en sistemas de inmersión temporal después de 30 días de cultivo. Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, Media general=4.35 cm, ET=0.21 cm).

Figura 17: Efecto del paclitaxel en la masa fresca de los brotes formados en sistemas de inmersión temporal después de 30 días de cultivo. Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, Media general=0.155 g, ET=0.007 g).

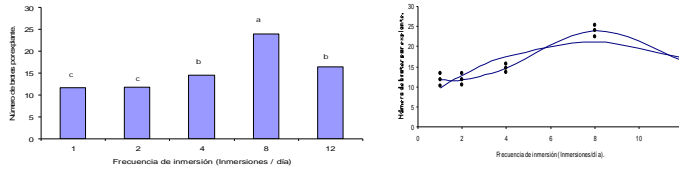


Figura 12: Efecto de la frecuencia de inmersión en la formación de brotes en sistemas de inmersión temporal después de 30 días. Izquierda: Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, Media general=15.82 brotes por explante, ET=0.40 brotes por explante). Derecha: ecuación $y = 6.12 + 3.80x - 0.24x^2$; $r^2 = 0.70$; $n = 15$.

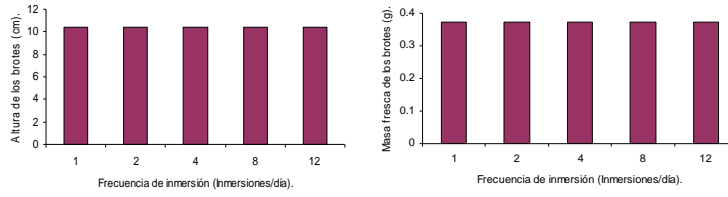


Figura 13: Efecto de la frecuencia de inmersión en la altura de los brotes en sistemas de inmersión temporal después de 30 días. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, Media general=10.39 cm, ET=0.61 cm).

Figura 14: Efecto de la frecuencia de inmersión en la masa fresca de los brotes en sistemas de inmersión temporal después de 30 días. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, Media general=0.373 g, ET=0.021 g).

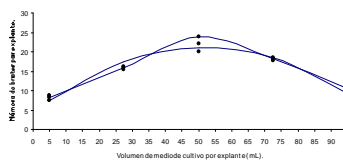
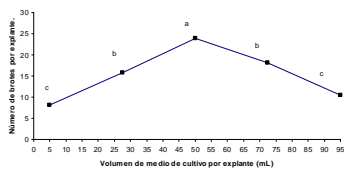


Figura 9: Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la formación de brotes en sistemas de inmersión temporal después de 30 días. Izquierda: Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, Media general=15.30 brotes por explante, ET=0.81 brotes por explante). Derecha: ecuación $y = 4.34 + 0.65x - 0.0063x^2$; $r^2 = 0.86$; $n = 15$.

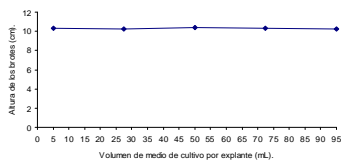


Figura 10: Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la altura de los brotes en sistemas de inmersión temporal después de 30 días. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, Media general=10.28 cm, ET=0.55 cm).

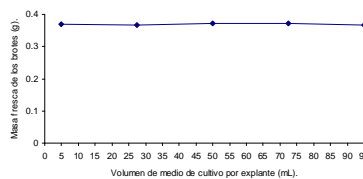


Figura 11: Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la masa fresca de los brotes en sistemas de inmersión temporal después de 30 días. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, Media general=0.369 g, ET=0.019 g).