

REGENERACION DE PLANTAS DE CAÑA DE AZUCAR POR CULTIVO "in vitro" DE MERISTEMOS APICALES DE TAMAÑO MINIMO

M.T. González Arnao, N.V. Donest*, A.S. Popov*

Laboratorio de Criobiología y Liofilización, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba, y Instituto de Fisiología de las Plantas, Moscú, Rusia.

RESUMEN. Se estableció una metodología para el cultivo "in vitro" de meristemos apicales de caña de azúcar de 0,5 mm de altura. Se estudió la influencia de la composición del medio de nutrientes, la intensidad de la luz y la aplicación de varios métodos de cultivo sobre el crecimiento y la viabilidad del tejido. Se logró el 100 % de regeneración de plantas utilizando un medio Murashige-Skoog modificado suplementado con las vitaminas de Staba, sacarosa (20 g/L), kinetina (0,5 mg/L), 6-benzilaminopurina (BAP) 0,5 mg/L, ácido giberélico (1 mg/L), carbón activado (2 g/L) y solidificado con agar (0,6 %).

ABSTRACT. It was established a methodology for the culture of sugar cane apical meristems with a length of 0,5 mm. The influence of nutrient medium's composition, lighting intensity and the application of different culture methods was studied on the growth and tissue's viability. The 100 % of plant regeneration was obtained using a modified Murashige-Skoog medium, supplemented with Staba's vitamins, sucrose (20 g/L), kinetin (0,5 mg/L), 6-benzilaminopurine (BAP) (0,5 mg/L), gibberelic acid (1 mg/L), activated charcoal (2 g/L) and solidified with agar (0,6 %).

INTRODUCCION

El tamaño mínimo cultivado de meristemos apicales de diferentes especies vegetales ha oscilado entre 0,2 mm y 0,5 mm de altura.¹ Esto contempla estrictamente el domo meristemático con hasta 2 primordios foliares, lo cual garantiza la carencia de tejido vascular, que unido a la intensa actividad metabólica y la alta concentración de auxinas, hacen posible el saneamiento de plantas infectadas por patógenos y confieren al tejido una mayor resistencia al frío en la conservación a largo plazo mediante la criopreservación.^{2,3}

La aplicación de esta técnica en caña de azúcar, generalmente contemplaba el explante a partir de plantas "in vivo" con un tamaño inicial superior a 3 mm de altura.^{4,5} Esto, además de resultar inconveniente para los propósitos anteriores, incluye los daños inherentes a la esterilización superficial del material original. El cultivo de meristemos con un tamaño inicial de 1 mm a 1,5 mm de altura y provenientes de plantas "in vitro", fue factible.⁶ Sin embargo, los requerimientos de cultivo que resultaron favorables para estas condiciones, no garantizaron el buen desarrollo y la regeneración de meristemos de menor tamaño.

Por tal razón, el objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la influencia de diferentes factores en el cultivo "in vitro" de la caña de azúcar (medio de nutrientes, efecto de la intensidad de la luz y comparación de varios métodos), con vistas a establecer una metodología capaz de garantizar la viabilidad de los meristemos apicales de 0,5 mm de altura, aplicable al saneamiento, la criopreservación y los programas de mejoramiento.

MATERIALES Y METODOS

El explante de los meristemos se realizó a partir de plantas establecidas "in vitro", cultivadas en el medio de propagación⁵ a una temperatura de 24°C, un fotoperíodo de 16 h/d y una intensidad de 5 000 a 8 000 lx. La variedad utilizada fue la C-8751.

Los experimentos se realizaron bajo un estereomicroscopio colocado en un flujo laminar y los meristemos se explantaron con una altura inicial de 0,5 mm.

El cultivo de los meristemos se realizó en placas Petri sobre un medio de nutrientes base (medio 1), compuesto por los elementos propuestos por Murashige-Skoog⁷ y suplementado con las vitaminas de Staba, kinetina 0,5 mg/L, 6-Benzilamino purina (BAP) 0,5 mg/L, sacarosa 20 g/L y solidificado con 0,6 % de agar.

La formulación de las vitaminas de Staba contempla: ácido fólico 0,5 mg/L, Riboflavina 0,5 mg/L, Biotina 1 mg/L, Pantotenato de calcio (B₃) 1 mg/L, Piridoxina 1 mg/L, Tiamina 1 mg/L, Acido Nicotínico 2 mg/L y Cloruro de colina 1 mg/L. El pH del medio de nutrientes se ajustó a 5,7.

Se estudió la influencia de modificar la composición del medio 1 mediante la adición de:

- carbón activado (2 g/L)
- diferentes concentraciones de Kinetina y BAP (0,1 a 0,6 mg/L)
- ácido giberélico (0,1 a 2 mg/L)

Las condiciones de cultivo se mantuvieron controladas como en el caso de las plantas donantes respecto a la temperatura (24°C) y el fotoperíodo (16 h/d), pero se estudió el efecto de la intensidad de la luz sobre la regeneración de las plantas en el intervalo entre 3 000 a 11 000 lx.

La evaluación del crecimiento se realizó mediante la medición de los regenerantes a los 15 d, calculándose los % de regeneración en planta a los 30 d. Posteriormente, las plántulas se pasaron a un medio de enraizamiento y a tierra.

La efectividad del método propuesto se comparó con otros métodos utilizados para el cultivo de meristemos apicales^{8,4,6} para caña de azúcar.

RESULTADOS Y DISCUSION

El hecho de realizar el explante de los meristemos a partir de plantas cultivadas "in vitro", permite disponer de un material biológico fisiológicamente homogéneo, determinar la edad del cultivo donante apropiada para el explante, evitar los daños al tejido por la utilización de los agentes químicos de esterilización, y manipular un material aséptico libre de contaminantes.

La influencia de la composición del medio de nutrientes en el cultivo de los meristemos se recoge en las Tablas I-III

La presencia del carbón activado en el medio de nutrientes garantizó un mejor desarrollo y viabilidad del tejido (Tabla I). El medio base sin carbón, reflejó retrasos en el crecimiento y una recuperación que no rebasó el 70 %. El efecto favorable de este componente está relacionado con su capacidad de adsorción de los fenoles y otras sustancias oxidadas tóxicas a las células.^{9,10}

TABLA I

Efecto del carbón activado en el medio de nutrientes sobre la viabilidad de los meristemos

Medio de Cultivo	Crecimiento (mm)	Regeneración de Plantas (%) 30 d
	15 d	
A) Medio 1 + Carbón Act	9,000	100
B) Medio 1 - Carbón Act.	6,110	70

Roca et al.¹¹, observaron durante la conservación de ápices de yuca a corto y mediano plazo, la posibilidad de limitar la degradación clorofílica y la necrosis de la raíz utilizando carbón activado en el me-

dio de nutrientes. Igualmente se ha comprobado su efectividad en los medios de recuperación luego de la crioconservación de meristemas de palma de aceite.¹²

Para los reguladores del crecimiento la mejor combinación en el medio fue la concentración de 0,5 mg/L para ambos componentes (Tabla II).

TABLA II

Efecto de la concentración de citoquininas en el medio de nutrientes sobre la viabilidad de los meristemas

Concentración Decitoquininas (mg/l)	Reclimiento (mm) (15 D)	
	Kinetina	6-benzil amino purina
0,1	0,400	0,400
0,2	0,760	0,600
0,3	8,060	4,870
0,4	8,380	6,890
0,5	8,770	8,460
0,6	8,790	8,450

Concentración de cada citoquinina en el medio A de la Tabla I

Concentraciones superiores no diferenciaron significativamente los resultados, además de que pueden producir aberraciones cromosómicas y pérdidas de las características originales de la planta. No obstante, el nivel hormonal disponible al cultivo resulta inferior debido a la presencia del carbón activado en el medio.^{13,14}

En cuanto al ácido giberélico la concentración de 1 mg/L resultó la más adecuada con relación al crecimiento, la viabilidad por su parte se mantuvo constante en el rango estudiado (Tabla III). Concentraciones superiores no incrementaron los resultados (datos no mostrados).

TABLA III

Efecto de la concentración de ácido giberélico en el medio de nutrientes sobre la viabilidad de los meristemas

Concentración De ácido giberélico (mg/l)	Crecimiento (mm) (15 d)	Regeneración de plantas (%)
0	3,032	86
0,1	9,067	83
1,0	5,308	83
2,0	6,596	80

Concentración de ácido giberélico en el medio A de la Tabla I

La mejor combinación de medio de nutrientes se empleo para el cultivo de los meristemas a diferente intensidad de luz. Los resultados obtenidos con relación a la regeneración de plantas, reflejan la iluminación de 8 000 lx como la más favorable. (Tabla IV).

TABLA IV

Efecto de la intensidad de la luz sobre la regeneración de plantas

Iluminación(10 ³ lx)	Regeneración de plantas (%) (30 D)
3	52
4	61
5	76
7	96
8	100
10	91
11	80

La Tabla V demuestra la efectividad del método desarrollado para el cultivo de los meristemas de caña de azúcar de 0,5 mm en comparación con otros métodos empleados para el cultivo de meristemas apicales. No sólo se evidenció un crecimiento acelerado del

tejido, sino que además fue posible la regeneración del 100 % en plantas.

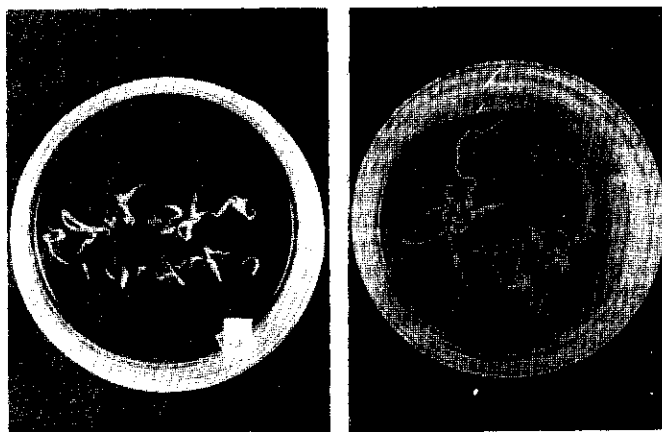
Las Figuras 1 2 y 3 muestran diferentes etapas del cultivo de meristemas.

CONCLUSIONES

Se estableció una metodología para el cultivo "in vitro" de meristemas apicales de caña de azúcar de un tamaño mínimo, la cual garantiza el desarrollo adecuado del tejido y el 100 % de su regeneración en plantas.

La misma comprende:

El explante de los meristemas con hasta dos primordios foliares a partir de plantas cultivadas "in vitro". Su cultivo en un medio Murashige-Skoog modificado con la adición de las vitaminas de Staba, sacarosa 20 g/L, kinetina 0,5 mg/L, BAP 0,5 mg/L, ácido giberélico 1 mg/L, carbón activado 2 g/L y solidificado con agar al 0,6%. La temperatura controlada a 24°C y un fotoperíodo de 16 h/d con una intensidad de 8 000 lx.



.Fig.1 y 2. Plantas regeneradas por cultivo de meristemas y pasadas al medio de enraizamiento.



.Fig.3. Plantas enraizadas y pasadas a tierra.

TABLA V

Aplicación de diferentes métodos de cultivo sobre la viabilidad de los meristemas

Metodo	Crecimiento (mm)	Regeneración de plantas (%) 30 d
	15 d	
Morel et al, 1954	0,681	0
Lee T.S.G., 1986	0,972	30
González Amao et al 1988	2,330	30
González Amao et al, 1989	9,000	100

BIBLIOGRAFIA

1. Kartha K.K. In: **Meristem culture and Cryopreservation, Plant Tissue Culture**, 181, T.A. Thorpe (ed.), Academic Press., Inc., 1981.
2. Espinoza N. y Estrada R. **Cultivo de Tejidos: Micropropagación, Conservación y Exportación de germoplasma de papa**. Documento de Tecnología Especializada 1, CIP, Perú, 1985.
3. Lizarraga R. y Tovar P. **Cultivo de Tejidos para la eliminación de patógenos**. Documento de Tecnología Especializada 3, CIP, Perú, 1987.

4. Lee T.S.G. **Turrialba(Costa Rica)**, 36(2), 231, 1986.
5. Komeva S. y Maribona R. **Micropropagación de la caña de azúcar**, Solicitud de Patente Cubana PRI 96-88, 1988.
6. González Amao M.T. y Urra C. **CENIC Ciencias Biológicas**, 21(2-3), 153, 1990.
7. Murashige T. and Skoog F. **Physiol. Plant.**, 15, 473, 1962.
8. Morel G. et Martin C. **Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus**. vol. 235, 1324, C.R. Held, Slanc, Acad. Sci., 1954.
9. Sugarawa S., Mori K., Matsushima H. and Takeushi M. **Z. Pflanzenphysiol.**, 109, 275, 1983.
10. Kuryiama A., Watanabe K., Ueno S. and Mitsuda H. **Cryo-Letters**, 11, 171, 1990.
11. Roca W., Reyes R. and Beltran J. In: **Effect of various factors on minimal growth in tissue culture storage of cassava germplasm**, Proc. 6th Symp. Int. Soc. for Tropical Root Crops: 441-446, 1984.
12. Bagniol S. and Engelmann F. **Cryo-Letters** 13, 253, 1992.
13. Weatherhead M.A., Burdon J. and Henshaw G.G. **Z. Pflanzenphysiol.**, 89, 141, 1978.
14. Ebert A. and Taylor H.F. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 20, 165, 1990.



El sistema posibilita la aplicación médica del ozono en sus diversas formas de administración sobre la base de su poder germicida, estimulante de los procesos de transporte y metabolización del oxígeno y su efecto modulador de la respuesta biológica. Se aplica con éxito en: **enfermedades infecciosas, vasculares, reumáticos, degenerativas** y es útil en **Oftalmología, Caumatología, Angiología, Gastroenterología, Geriatria, Terapia intensiva, etcétera.**

DATOS TECNICOS

- Producción de Ozono: Regulable a concentraciones
- entre 2 y 100 mg/l
- Consumo de electricidad: 0,3 kWh (máx)
- Enfriamiento: por aire
- Consumo de oxígeno: en dependencia del tratamiento

**Producido y exportado por :
CNIC**