

# Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en

# CAÑA (*Saccharum spp.*) DE AZÚCAR

**Castañeda-Castro, O.<sup>1</sup>; Gómez-Merino, F.C.<sup>1</sup>; Trejo-Téllez, L.I.<sup>2</sup>; Morales-Ramos, V.<sup>1</sup>; González-Arno, M.T.<sup>3</sup>; Martínez-Ocampo, Y.M.<sup>4</sup>; Gámez-Pastrana, R.<sup>4</sup>; Pastelín-Solano M.C.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, *Campus* Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km 348, Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz. C.P. 94946. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230. <sup>3</sup>Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Prolongación de Oriente 6 No. 1009, Orizaba, Veracruz. C.P. 94340. <sup>4</sup>Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Camino Peñuela-Amatlán s/n, Peñuela, Amatlán de los Reyes, Veracruz. C.P. 94945.

\*Autor responsable: fernandg@colpos.mx

## RESUMEN

**E**l mejoramiento genético de la caña de azúcar es determinante para desarrollar variedades resistentes a factores bióticos y abióticos y para incrementar los rendimientos en biomasa y sacarosa; sin embargo, dicho proceso se ve restringido debido al tiempo de liberación de una variedad que puede ser superior a 12 años. Una alternativa para reducir el plazo es el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), debido al potencial de cada célula vegetal para regenerar una planta completa. La micropropagación o propagación *in vitro* es una de las aplicaciones del CTV que permite una producción masiva en menor espacio y contribuye a acelerar los procesos de selección dentro de los programas de mejoramiento genético. Para la regeneración *in vitro* de plantas de caña de azúcar se ha utilizado el cultivo de protoplastos, células, callos, tejidos y órganos diversos; sin embargo, muchos de los protocolos establecidos presentan baja reproducibilidad debido al genotipo, vía de regeneración, condiciones del explante y ambiente. En este artículo se revisan avances sobre el cultivo *in vitro* en caña de azúcar y se analiza la perspectiva de esta técnica para su uso con fines agrícolas.

**Palabras clave:** Biotecnología, mejoramiento, propagación, vitroplantas.



## INTRODUCCIÓN

# Uno de los retos

que enfrenta la agroindustria de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) para ser más competitiva es aumentar su productividad y disminuir costos de producción, por lo cual es necesario introducir adelantos científicos y tecnológicos en todos los eslabones de la cadena de valor. A través del cultivo *in vitro*, la biotecnología permite producir plantas con pureza genética y calidad fitosanitaria que aseguran mayor amacollamiento en campo. La mayor parte de las variedades comerciales actuales de caña de azúcar son híbridos interespecíficos de *Saccharum officinarum* y *S. spontaneum* generados hace poco más de 100 años. La progenie obtenida de las primeras cruces fueron retrocruzadas con *S. officinarum* (cañas nobles) y, debido a que este proceso de nobilización implicó una transición asimétrica de cromosomas, los híbridos actuales son organismos poliploides (poseen hasta 200 pares de cromosomas) con genomas complejos, pero con una base genética restringida (poca variabilidad). Como consecuencia de esta complejidad, los procesos de mejoramiento genético son tardados y puede tomar 12 años o más para liberar una nueva variedad comercial. A pesar de esta limitante, los productores de caña requieren programas de mejoramiento genético extensivos a fin de lograr genotipos mejorados que se adapten a sitios específicos de cultivo. Por ello, las técnicas *in vitro* para la micropropagación masiva de plantas sanas a través de procesos de organogénesis o embriogénesis somática resultan determinantes para el establecimiento de programas de mejoramiento y producción masiva de semilla certificada.

Desde los estudios pioneros sobre inducción de callos llevados a cabo en Hawaii (EUA) en la década de 1960, el cultivo de células y tejidos de caña de azúcar se ha constituido como una herramienta muy valiosa para llevar a cabo diversas investigaciones y escalar la producción de plántulas a nivel comercial. Estos hallazgos condujeron al desarrollo de estrategias de aplicación de tecnologías, tales como micropropagación, desarrollo de nuevas variedades, conservación de germoplasma, eliminación de patógenos sistémicos y la ingeniería genética; parte importante de estos protocolos son los medios de cultivo que se usan (Figura 1).

## Medios para el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar

Los medios de cultivo más usados en caña de azúcar son los de Murashige



Figura 1. Plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) micropropagadas en medio de cultivo MS. A: Plántulas de la variedad Mex 69-290 en fase III de la micropropagación. B: Vitroplantas de la variedad ITV 92-1424. C: Vitroplantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) y White (1963), modificados para la multiplicación *in vitro* de la caña de azúcar.

Medio MS (1962)		Medio White (1963)	
Componente	Concentración en el medio (mg L <sup>-1</sup> )	Componente	Concentración en el medio (mg L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.000	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	200.00
KNO <sub>3</sub>	1,900.000	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	360.00
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	440.000	KCl	65.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000	KNO <sub>3</sub>	80.00
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	370.000	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.50
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.025	MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	5.00
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.025	KI	0.75
KI	0.830	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	16.40
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	22.300	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	3.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.250	FeNa EDTA	25.00
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8.600	Ácido nicotínico	0.50
FeNa EDTA	50.000	Piridoxina	0.50
Mio-Inositol	100.000	Tiamina HCl	0.10
Tiamina-HCl	40.000	Glicina	3.0
Cinetina	1.000	Sacarosa	20,000.00
Ácido 3 indolacético	0.0650		
Bencil aminopurina	0.300		
Ácido cítrico	150.000		
Ácido ascórbico	50.000		
Sacarosa	20,000.000		
Piridoxina	10.000		
Ácido nicotínico	5.000		
Glicina	30.000		
Biotina	10.000		
Arginina	5.000		

y Skoog (1962) y el de White (1963). Aunque a diferentes niveles, ambos medios contienen los nutrimentos esenciales (N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Na, Cl, Mn, Zn, B, Cu y Mo), reguladores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas), vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, glicina, biotina, arginina), inositol, fuente de carbono (sacarosa), antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico) y adsorbentes como el carbón activado (Cuadro 1).

El uso de explantes adecuados permite aprovechar los nutrimentos disponibles en el medio de cultivo al máximo. Por ello se recomienda utilizar ápices, ya que éstos contienen células con la capacidad de diferenciarse, presentan menos problemas de fenolización y están libres de contaminación. Por lo general, el medio MS sólido resulta mejor para la micropropagación de caña de azúcar

que el White, aunque en forma líquida ambos resultan favorables. Usando el medio MS, un adecuado balance entre auxinas y citocininas incrementa significativamente el número de brotes y el estado nutricional de las vitroplantas (Castañeda-Castro *et al.*, 2009). Una vez que el explante supera la etapa de iniciación, éste comienza a crecer y a producir brotes laterales, formando pequeñas cepas dentro de los frascos de cultivo, con lo que se inicia la etapa de multiplicación, en la cual se separan los nuevos brotes para ser trasladados al medio MS líquido. Los sub-cultivos deben realizarse cada dos a tres semanas, debido a que la caña crece muy rápido, lo que hace que el medio se agote. En caña de azúcar se recomiendan no más de 10 ciclos de cultivo *in vitro*, esto debido a que durante cada ciclo de cultivo pueden ocurrir variaciones somaclonales.

### Morfogénesis *in vitro* de caña de azúcar

Aunque la caña de azúcar produce semilla botánica que es usada para los programas de mejoramiento en sus fases tempranas, la principal forma de reproducción en variedades comerciales es vegetativa a través de yemas nodales y rizomas. Dada la factibilidad de reproducción vegetativa, la micropropagación ofrece un método fácil y rápido para la producción de vitroplantas a gran escala, usando células y tejidos meristemáticos y no meristemáticos como explantes. Las plantas pueden ser regeneradas directamente a partir del explante (regeneración adventicia) o indirectamente a través de callos que se derivan de éste (regeneración *de novo*). En caña de azúcar es posible producir nuevas plantas a partir de regeneración directa, tanto de meristemos apicales como axilares, y también a partir de tejidos foliares inmaduros e inflorescencias. Como sucede en la mayoría de las especies, las plantas de caña reproducidas *in vitro* a partir de meristemos mantienen mayor pureza genética y son fenotípicamente más estables que las que se producen a partir de callos. Por tanto, cuando se quiere generar variación somaclonal, se recomienda usar el cultivo de callos tanto a partir de hojas inmaduras como de inflorescencias (Figura 2).

### Organogénesis

La organogénesis directa involucra la regeneración de tallos a partir de meristemos apicales o cortes de hojas inmaduras, tras la exposición a por lo menos una citocinina (benciladenina y cinetina) y una auxina (ácido naftalenacético: ANA) a una alta relación citocinina/auxina. En seguida, se induce el enraizamiento con la aplicación de la auxina ácido indolbutírico o con la remoción de los reguladores del crecimiento del medio de cultivo y la adición de sacarosa. También es posible inducir organogénesis directa en

condiciones de iluminación constante, sólo en presencia de ácido naftalenacético o indirectamente por medio de regeneración *de novo*, a partir de callos que generen meristemos en respuesta a auxinas (para la formación de tallos) y citocininas (para la formación de raíces). El enraizamiento de los explantes se estimula al retirar las auxinas del medio, remover las hojas o exponer el cultivo a 15 °C, por cuatro a seis semanas. Las respuestas de los genotipos de caña pueden variar y en general es necesario optimizar los medios en cuanto a concentraciones y balance de reguladores de crecimiento.

### Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es, posiblemente, el método más usado para la propagación intensiva de plantas de caña de azúcar y se ha constituido como un componente determinante en los procesos de transformación genética. Los explantes usados provienen principalmente de tejidos foliares y pueden mantenerse por varios meses, sin que muestren pérdida de potencial de regeneración. La embriogénesis somática se induce en respuesta a auxinas, principalmente 2,4-D. Los embriones se desarrollan a partir de células jóvenes ricas en vacuolas y reservas de almidón. Como sucede en la organogénesis, la regeneración vegetal puede ocurrir sin la formación de callos, cuando los explantes se exponen a bajos niveles de 2,4-D, tidiazurón, ácido clorofenoxiacético y ANA. En la embriogénesis somática, los embriones son inducidos a partir de callos por medio de la aplicación de 2 a 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Una vez que se remueve la auxina, el embrión puede germinar sin la adición de otro regulador, aunque en algunas variedades el ANA y la cinetina inducen enraizamiento. Las aplicaciones comerciales de estas tecnologías ya son una realidad a través de sistemas de biorreactores de gran escala.



Figura 2. Adaptación exitosa de plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) micropropagadas en medio de cultivo MS. Previo a su siembra en campo, las plantas pasaron por periodos de aclimatación en invernadero.

### Bancos de germoplasma y estabilidad genética

La conservación de los bancos de germoplasma es parte integral de los programas de mejoramiento en caña de azúcar. Los métodos actuales incluyen grandes colecciones en campo, en superficies considerables altamente demandantes de mano de obra y otros recursos. Además, estas colecciones son vulnerables a los desastres naturales y susceptibles al ataque de plagas y enfermedades. Los bancos de germoplasma *in vitro* son una alternativa que debe considerarse para la conservación de los recursos genéticos de caña de azúcar. Para ello, los meristemos apicales y axilares se mantienen en medio mínimo para el crecimiento entre 18 y 25 °C y transferencias a medios frescos, cada seis a 24 meses, dependiendo del genotipo, u optarse por la crio-conservación (González-Arnan et al., 2008).

### Material libre de patógenos

El cultivo *in vitro* se ha usado para recuperar material de interés libre de patógenos en líneas infectadas. A través del cultivo de meristemas

es posible eliminar virus, bacterias y fitoplasmas (Snyman et al., 2011).

### Transformación genética

El cultivo *in vitro* juega un papel preponderante en los procesos de transformación genética. Junto con éste, los genotipos de caña de azúcar, tipos de explantes, agentes selectivos y cepas de *Agrobacterium* determinan la tasa de transformación genética. El cultivo de callos meristemáticos se ha usado tanto para enfoques biobalísticos como para los mediados por *Agrobacterium* (Scortecci et al., 2012).

### Variación somaclonal y nuevos caracteres

El cultivo de callos de caña de azúcar presenta una considerable variación de célula a célula y entre diferentes plántulas, debido principalmente a cambios en el cariotipo de los materiales generados. La variación somaclonal es enorme y ofrece una oportunidad para el mejoramiento genético, ya que afecta caracteres tanto morfológicos (altura de planta o el color de tallo) como fisiológicos (producción de biomasa, rendimiento de azúcar o porcentaje de fibra). La variación somaclonal también sirve para identificar y seleccionar células y clones de caña de azúcar tolerantes a salinidad y a sequía, y puede generar variación adicional a la que se origina a través de mutagénesis.

### Mutagénesis *in vitro*

La mutación inducida se ha convertido en una herramienta de gran impacto en programas de mejoramiento que complementan las estrategias convencionales. La principal ventaja de ésta es su habilidad para cambiar uno o algunos caracteres de cultiva-

res sobresalientes, sin alterar todo el genotipo. Para generar mutagénesis en caña de azúcar se han usado rayos gama, etilmetanosulfonato, azida y nitrato de sodio (Snyman et al., 2011).

### Intercambio de materiales entre países

A fin de ampliar la base genética, los programas de mejoramiento que se implementan en todo el mundo recurren al intercambio de materiales entre países y los materiales que aún no se encuentran en fases avanzadas de selección y que, al llegar al país receptor, tienen que pasar por un largo periodo de cuarentena antes de llegar a los centros de mejoramiento. El cultivo *in vitro* ofrece una alternativa para reducir tiempos y costos.

### Multiplicación de clones

Una vez que se produce un nuevo genotipo, éste se propaga vegetativamente a través de cortes de entrenudos para obtener poblaciones clonales. Aunque es un proceso relativamente simple, éste presenta las desventajas de baja tasa de multiplicación y posibilidad de transmitir enfermedades. La multiplicación está determinada por el número de yemas que emite cada corte de entrenudos, y la eficiencia de la propagación también puede estar afectada por la transferencia sistémica de patógenos. A través del cultivo *in vitro* se han mostrado incrementos sustantivos en la emisión de tallos, en rendimiento de azúcar y en vigor de las plantas.

### Ventajas del cultivo *in vitro* en caña de azúcar

El cultivo *in vitro* de caña de azúcar permite obtener grandes cantidades de plantas, multiplicar variedades sobresalientes, integrar réplicas de bancos de germoplasma establecidos en campo, garantizar la sanidad de los clones y detectar oportunamente la



presencia, tolerancia o resistencia a diferentes tipos de factores bióticos y abióticos, además de facilitar introducción de nuevos genes a través de la ingeniería genética. Las plantas propagadas *in vitro* generalmente presentan un mayor crecimiento y vigor y producen semilla botánica de alta calidad. En comparación con la multiplicación nodal, el cultivo *in vitro* ha incrementado el número de tallos hasta en 25% (Digonzelli *et al.*, 2009) y el rendimiento de azúcar hasta en 15% (Pérez-Ponce *et al.*, 2000).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) permiten incrementos significativos del coeficiente de multiplicación y automatización en caña de azúcar (Figura 3). Los SIT disminuyen los costos de producción por mano de obra, ahorran energía, incrementan la eficiencia productiva del proceso de micropropagación, y al requerir menor espacio propician un aumento de las capacidades productivas en las denominadas biofábricas. La micropropagación automatizada a través de los SIT, tiene la posibilidad de producir grandes volúmenes de plantas y mayor facilidad del escalado, los brotes están siempre en contacto con el medio de cultivo y, por tanto, la absorción de los nutrientes y la tasa de crecimiento se ven estimulados. Estos sistemas están diseñados con un sistema computarizado que brinda las máximas oportunidades para el monitoreo y control de las condiciones microambientales (Cortegaza, 2013).

## CONCLUSIONES

**Actualmente** existen grandes posibilidades de usos de la tecnología de cultivo *in vitro* en caña de azúcar. Aún no se aprovecha la totalidad de perspectivas que ofrece la variación somaclonal para producir nuevos caracteres y al propio cultivo *in vitro* para analizar la resistencia a factores bióticos y abióticos. El cultivo *in vitro* permite reducir la tasa de crecimiento de variedades que se conservan en bancos de germoplasma, aunque su uso potencial y el de las técnicas de crio-conservación aún no se aprovechan íntegra y eficientemente en México. La micropropagación a gran escala de variedades de interés y el uso de esta técnica para generar materiales libres de patógenos, son procesos que se han incorporado de manera eficiente en varios ingenios azucareros tanto en México como en el mundo.



Figura 3. Elementos que forman parte de un sistema de inmersión temporal en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) micropropagadas en medio de cultivo MS.

## AGRADECIMIENTOS

Al Fideicomiso Institucional y a la Línea Prioritaria de Investigación 5: Biotecnología microbiana, vegetal y animal del Colegio de Postgraduados, por los apoyos y las facilidades brindadas. Los autores también agradecen al Dr. Jericó J. Bello-Bello y al M. C. Roberto Loyo-Joachín por el material fotográfico facilitado.

## LITERATURA CITADA

- Castañeda-Castro O., Gómez-Merino F.C., Trejo-Téllez L.I., Pastelín-Solano M.C., Martínez-Ocampo Y.M., González-Arno M.T., Guevara-Valencia M. 2009. Nutritional Status and Growth of Sugarcane Vitroplants in Response to Growth Regulators. *Terra latinoamericana*. 27:177-185.
- Cortegaza Á.L. 2013. Guía para la micropropagación *in vitro* de la caña de azúcar. Fundación Produce. Sinaloa. A. C. 39 p.
- Digonzelli, P. A., E. R. Romero, J. Scandaliaris, y J. Giardina. 2009. Comparación de la calidad de semilla de caña de azúcar en el segundo corte según el método de saneamiento. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 86: 1-8.
- González-Arno M.T., Panta A., Roca W.M., Escobar R.H., Engelmann F. 2008. Development and large-scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organic Culture* 92: 1-13.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Pérez-Ponce J.N., Suárez-Castellá M., Orellana-Pérez P. 2000. Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Biología Vegetal* 1: 3-12.
- Scortecci K.C., Creste S., Calsa T., Xavier M.A., Landell M.G.A., Figueira A., Benedito V.A. 2012. Challenges, Opportunities and Recent Advances in Sugarcane Breeding. *In: Dr. I. Abdurakhmonov* (Ed). *Plant Breeding*. InTech, Nwy York, USA. pp. 267-296.
- Snyman S.J., Meyer G.M., Koch A.C., Banasiak M., Paula-Watt M. 2011. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47: 234-249.
- White P. 1963. *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press. New York, USA. 228 p.