

# REDUCCIÓN DE COSTOS EN LA MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.)

## COST REDUCTION IN THE MICRO-PROPAGATION OF SUGAR CANE (*Saccharum* spp.)

**Criollo-Chan, M.A.<sup>1</sup>; Osnaya-Gonzalez, M.L.<sup>1</sup>; Robledo-Paz, A.<sup>2</sup>; Monsalvo-Espinosa, J.A.<sup>1</sup>; Echeverría-Echeverría, S.T.<sup>3</sup>; Alamilla-Magaña J.C.<sup>1</sup>; Caamal-Velázquez, J.H.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados *Campus* Campeche, Km 17.5 Carretera Federal Haltunchen-Edzna, Si-hochac, Champotón, Campeche. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>3</sup>CBTA 13 X'Matkuil, Ex Hacienda X'Matkuil, Mérida, Yucatán.

\*Autor de correspondencia: hcaamal@colpos.mx

### RESUMEN

Se desarrollaron estrategias para la disminución de costos en la micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), iniciando con el establecimiento de un protocolo para su propagación *in vitro*, a partir de meristemos apicales de la variedad CP 94-1674 como primera fase y su escalamiento posterior en bioreactores de inmersión temporal y la implementación de Diodos Emisores de Luz (LED), como estrategias para disminuir los costos de producción. La multiplicación convencional se hizo en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con un 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) y 3 mg L<sup>-1</sup> de Acido 2,4-diclorofenociacético; y para el escalamiento en Bioreactores de Inmersión Temporal se utilizó el medio MS suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Se obtuvo una tasa de multiplicación diez veces mayor que la propagación convencional con disminución de 30% del medio de cultivo y 10% de mano de obra. Se implementó la utilización de luz LED como estrategia para la disminución en el consumo de energía eléctrica y costos en los materiales utilizados.

**Palabras claves:** Bioreactores de Inmersión temporal, Diodos Emisores de Luz, costos.

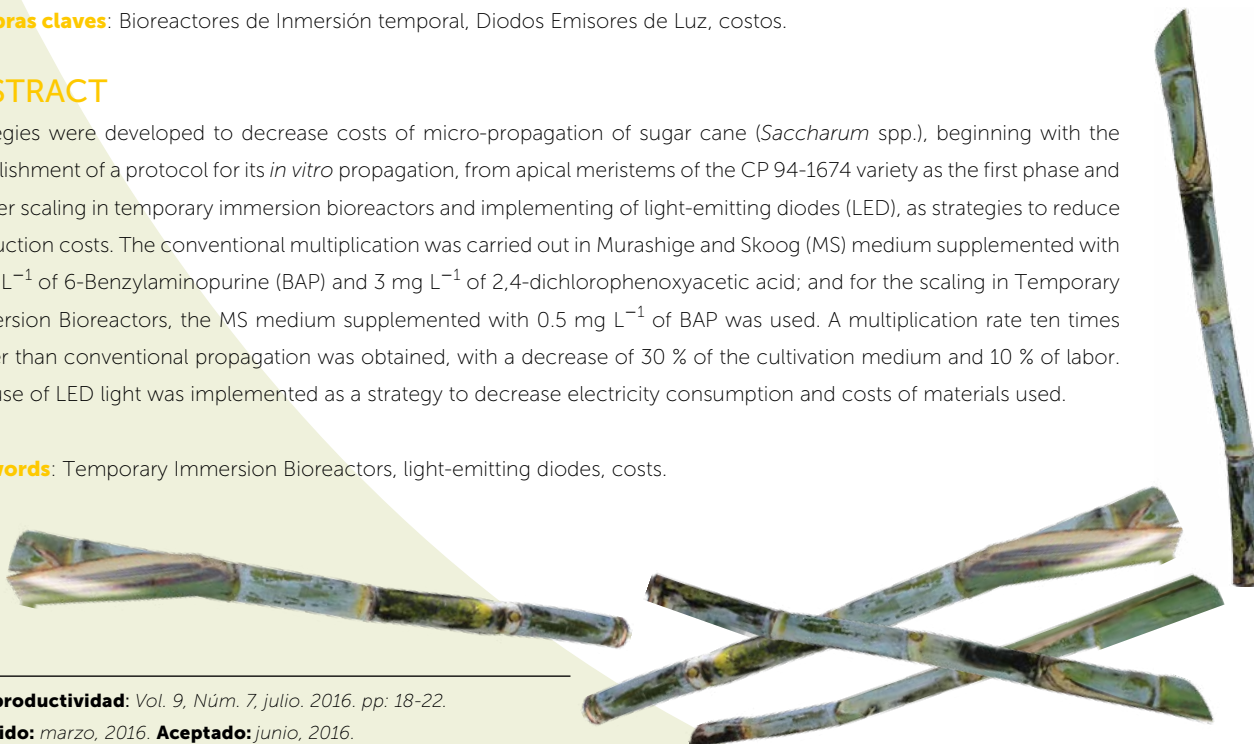
### ABSTRACT

Strategies were developed to decrease costs of micro-propagation of sugar cane (*Saccharum* spp.), beginning with the establishment of a protocol for its *in vitro* propagation, from apical meristems of the CP 94-1674 variety as the first phase and its later scaling in temporary immersion bioreactors and implementing of light-emitting diodes (LED), as strategies to reduce production costs. The conventional multiplication was carried out in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> of 6-Benzylaminopurine (BAP) and 3 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; and for the scaling in Temporary Immersion Bioreactors, the MS medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP was used. A multiplication rate ten times higher than conventional propagation was obtained, with a decrease of 30 % of the cultivation medium and 10 % of labor. The use of LED light was implemented as a strategy to decrease electricity consumption and costs of materials used.

**Keywords:** Temporary Immersion Bioreactors, light-emitting diodes, costs.

**Agroproductividad:** Vol. 9, Núm. 7, julio, 2016, pp: 18-22.

**Recibido:** marzo, 2016. **Aceptado:** junio, 2016.



## INTRODUCCIÓN

# La caña

de azúcar (*Saccharum spp.*) (Poaceae) es originaria de Nueva Guinea (Alejandre-Rosas *et al.*, 2010), y es el cultivo primario a nivel mundial para obtener azúcar y otros subproductos, tales como alcohol, alimento para ganado, abono orgánico, combustible, pulpa, papel y tableros aglomerados (Salgado *et al.*, 2001; Guerrero, 1999 y Bongiovanni, 2008); su propagación se realiza mediante estacas (partes de tallos con yemas), y a pesar de ser el método más utilizado, tiene como principal desventaja, facilitar la dispersión de enfermedades que ocasionan pérdidas en el rendimiento (Díaz *et al.*, 2001), además de ser lentos y con baja tasa de multiplicación. Considerando que los productores requieren de una multiplicación rápida, con suficiente cantidad y semilleros puros de nuevas variedades, la micropropagación es una herramienta útil para la multiplicación masiva (Singh *et al.*, 2001; Caamal-Velazquez *et al.*, 2014). En la actualidad el uso de Bioreactores se Inmersión Temporal (BIT) para la propagación masiva de plantas se ha vuelto habitual, sin embargo, hay factores que se deben considerar antes de convertirlo en rutinario, tales como, los modelos RITA<sup>®</sup>, BIOMINT<sup>®</sup>, CETIS<sup>®</sup>, entre otros. Utilizando los mismos principios se pueden establecer BIT's domésticos y funcionales, como por ejemplo el desarrollado por Escalona *et al.* (1999), que se implementa con materiales locales y costo menor al de los comerciales. Con el desarrollo y uso de iluminación LED en los laboratorios de micropropagación, se ha comenzado a explorar la respuesta de las plantas a la iluminación LED, cuyas principales ventajas es su alta durabilidad (más de 30,000 horas), marcada disminución en el consumo energético (12 w h<sup>-1</sup> promedio). Existen antecedentes en orquídeas (Abdullahil *et al.*, 2011), caña de azúcar (Gomes da rocha *et al.*, 2013), ornamentales (Wu y du Toit, 2012), entre otros cultivos. En este trabajo se demuestra que la propagación de plantas se aumenta en gran medida implementando la utilización de lámparas LED y los BIT, reduciendo costos de producción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Campeche, ubicado en Sihochac, Champotón, Campeche, México (19° 49' 068" N, 90° 546' 334" O). Se utilizaron ápices de caña de azúcar de la variedad CP 94-1674, de nueve meses de edad. El material vegetal fue procedente del Campo Experimental del Colegio de Postgraduados Campus Campeche.

### Multiplicación convencional de brotes

Una vez que se registró la esterilidad de los explantes, se indujeron a la generación de brotes mediante siembra en frascos de vidrio de 250 ml con 30 ml de medio MS sólido (Murashigue and Skoog, 1962), suplementados con 30% de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina, 3 mg L<sup>-1</sup> de Acido 2,4-diclorofenociacético y solidificado con 0.3% de Gellan Gum (Medio

MCC, Cuadro 1), se sellaron e incubaron por 30 días en un cuarto con fotoperiodo 16 h luz por 8 h oscuridad a 25±2 °C. Los sub cultivos se realizaron cada 30 días hasta obtener el número de brotes deseados. Para la realización de los análisis respectivos se utilizaron cuatro explantes por frasco con cuatro repeticiones para tener un total de 20 explantes, se realizaron experimentos independientes para la realización de los análisis correspondientes.

### Multiplicación mediante Bioreactores de Inmersión Temporal (BIT)

Con el objetivo de escalar la multiplicación de brotes de caña, se utilizaron Bioreactores de Inmersión Temporal (BIT); y como un paso previo se sumergieron en medio MS suplementado con 30% de Sacarosa y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (MLH líquido) (Cuadro 1) por siete días e incubaron con fotoperiodo de 16 h luz por 8 h oscuridad, a 25±2 °C.

Transcurrido el tiempo de adaptación al medio líquido se aplicaron los BIT's con medio MLH líquido, utilizando dos tamaños de brote y tres volúmenes de medio, los parámetros fueron medidos a los 15 y 30 días (Cuadro 2). Para los BIT's se utilizaron frascos de vidrio de 900 ml de capacidad y para su uso se aplicaron las condiciones reportadas por Lorenzo *et al.* (1998) quien recomienda inmersiones de un minuto y una aireación del mismo periodo con frecuencia de seis horas.

### Incubación utilizando Diodos Emisores de Luz (LED)

Los explantes en proceso de multiplicación utilizando el medio MCC

**Cuadro 1.** Concentración hormonal de los Medios de cultivos para la inducción de brotes de caña de azúcar (*Saccharum spp.*).

Medio	6- bencilaminopurina (BAP)	Acido 2,4-diclorofenociacético (2,4-D)
MCC	1.0 mg L <sup>-1</sup>	3.0 mg L <sup>-1</sup>
MLH	0.5 mg L <sup>-1</sup>	-

**Cuadro 2.** Establecimiento de tratamientos en el escalamiento de multiplicación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

Longitud de explante (cm)	Volúmenes de medio (ml)		
	200 Inicio	300 inicio	400 inicio
3	20 explantes	20 explantes	20 explantes
5	20 explantes	20 explantes	20 explantes

(Cuadro 1) Fueron sometidos a incubación con 100% iluminación LED blanca, con picos de longitud de onda 460 y 560 nm y se utilizó como control la iluminación fluorescente, con picos de longitud de onda de 545-610 nm, 36W. El sistema LED utilizado fue el modelo 5050-1M, con un controlador y fuente de poder de 12 Volts (Shendk Model SDK-0605); se utilizaron tres explantes por frasco de 500 ml y se realizaron tres repeticiones.

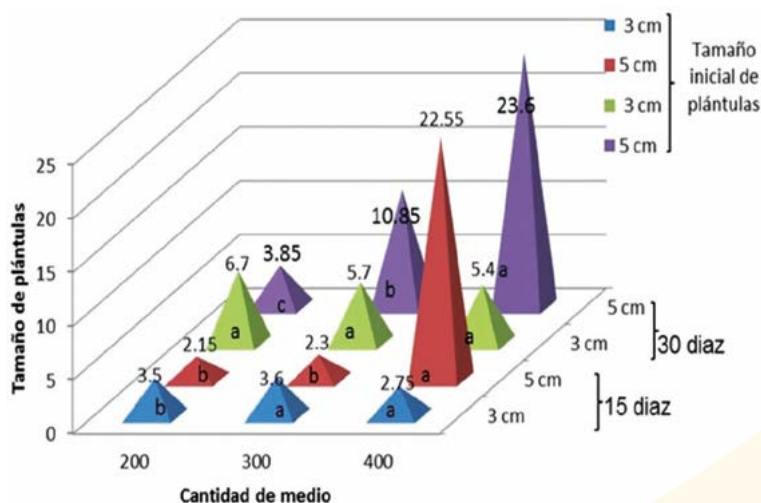
**Enraizamiento de brotes de caña de azúcar y aclimatación de plántulas**

Los brotes obtenidos en la multiplicación, fueron puestos en Bioreactores de Inmersión Temporal, para formar raíces. Se utilizó medio MS líquido, con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico, 0.002 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético y 3.9 mg L<sup>-1</sup> de ácido indobutírico. Cada biorreactor contenía 400 ml del medio de enraizamiento. Una vez que formaron raíces las plántulas pasaron a aclimatación, en cuya fase se utilizaron las plántulas *in vitro* lavadas con una solución de 3 g L<sup>-1</sup> del fungicida Benomat® (VELSIMEX) y una solución de 3 g L<sup>-1</sup> bactericida Agri-mycin® 500 (Pfizer), posteriormente fueron sembradas en charolas de unicel de 60 cavidades, que contenían suelo tipo acrisol, Sustrato comercial Turba Rubia FSK2 (Floraska®) en proporción 1:1; y fueron tapadas con plástico transparente y colocadas en una casa sombra para su adaptación, a temperatura ambiente (25±2 °C) la aclimatación de las plantas se realizó en

todo el año. En esta etapa se evaluó su adaptación *ex vitro* y supervivencia.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Al inicio del establecimiento se obtuvieron ocho brotes y callos de los ápices utilizando el medio MCC, tomando los ápices como plantas madre, los cuales fueron utilizados para la implementación de estos trabajos. Utilizando el medio MLH a los 30 días se logró la obtención de un promedio de cuatro brotes por explante, esto concuerda con lo encontrado con Criollo-Chan (2014), quien utilizando un medio con BAP y 2,4-D obtuvo en promedio tres brotes por explante de la variedad CP-94-1674. Parreño (2012) reporta haber obtenido en promedio 10 brotes por explante a partir de meristemos apicales, lo cual indica estar en un rango medio de obtención de brotes de caña. Una vez establecidos los ápices se prosiguió al establecimiento de la metodología para la propagación mediante el uso de BIT's. La Figura 1 muestra los valores de tratamientos realizados para el establecimiento del método de propagación utilizando BIT's; observando que 400 ml de medio MLH son suficientes para multiplicar 20 explantes cuando se utilizan frascos de 900 ml, de la misma manera se observa que los explantes con longitud de cinco cm son los mejores para la micropropagación utilizando BIT's. Lo anterior se corroboró con las mediciones a 15 y 30 días, registrando en promedio 23 brotes por explante, usando 20 ml de medio MLH por explante al inicio de la multiplicación. Lorenzo *et al.* (1998) utilizaron 50 ml de medio por explante y obtuvieron 23 explantes partiendo de longitudes iniciales de 0.5 cm de longitud, la diferencia radica en que con la metodología desarrollada en el presente estudio, desde los 15 días de multiplicación se obtienen estas cifras, lo cual es relevante pues disminuye el tiempo de multiplicación a la mitad (Figura 1). De aquí en adelante se utilizaron 400 ml de medio con explantes de 5 cm de longitud promedio.



**Figura 1.** Tasa de multiplicación de explantes de *Saccharum* spp., en BIT's utilizando diferentes cantidades de medio MLH y diferentes tamaños de explante. Los valores fueron comparados por prueba de Tukey ( $\leq 0.05$ )

desarrollada en el presente estudio, desde los 15 días de multiplicación se obtienen estas cifras, lo cual es relevante pues disminuye el tiempo de multiplicación a la mitad (Figura 1). De aquí en adelante se utilizaron 400 ml de medio con explantes de 5 cm de longitud promedio.

Cuando se trata de micropropagación de

caña de azúcar, las metodologías convencionales (Medio semisólido) no pueden faltar pues son el inicio de la micropropagación, sin embargo una vez realizado el establecimiento en la etapa de multiplicación, la utilización de BIT's se hace importante para propagar masivamente caña de azúcar, ya que según lo reportado por Lorenzo *et al.* (1998) utilizar los BIT's disminuye 46 % los costos de producción debido principalmente a la eliminación del solidificante. Según Kodym y Zapata-arias (2001) el 90% de los costos se deben al azúcar y gelificante; Raghu *et al.* (2007) mencionan que el uso de medios líquidos ayuda a disminuir los costos de

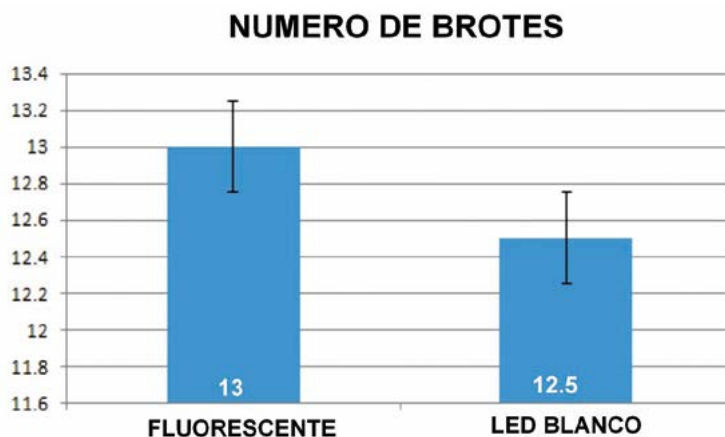
producción de *Centella asiática*. El uso de BIT's tiene la ventaja de utilizar medios líquidos lo que reduce por lo menos 30% de los costos del medio de cultivo. Al ser los BIT's, un sistema abierto, el intercambio gaseoso evita la acumulación de compuestos nocivos para los explantes (Etileno o ácido absísico), lo cual permite que los estomas tengan buena regulación de cierre y apertura, lo que aumenta la tasa de sobrevivencia al momento de la aclimatización; y de la misma manera el tener un sistema de inmersión temporal permite que los explantes sean sumergidos homogéneamente aumentando la tasa de multiplicación.

Con el fin de disminuir aun más los costos de producción de plantas se visualizó como un potencial punto de apoyo la iluminación, normal-

mente los laboratorios de propagación utilizan lámparas fluorescentes de 39 watts, lo que si bien representa un ahorro energético en cuanto a otro tipo de lámparas (Las de tungsteno por ejemplo), con los adelantos de la tecnología se cuenta con lámparas LED T8 de 22 watts (Tecnolite®) las cuales son equivalentes a lámparas fluorescentes de 39 watts. La Figura muestra la tasa de multiplicación de caña de azúcar cuando se utiliza la propagación convencional (medio semisólido).

Como se observa en la Figura 2, no se visualizan diferencias significativas en la tasa de multiplicación al utilizar lámparas LED cuando se utiliza la pro-

pagación convencional. Existen algunos estudios sobre micropropagación de caña utilizando iluminación LED, sin embargo, se enfocan a otros tipos de iluminación LED, por ejemplo, Gomes da Rocha *et al.* (2013), utilizó LED rojo, azul y verde, además de combinar la concentración de sacarosa y se enfocó en la tasa



**Figura 2.** Promedio de la tasa de multiplicación de brotes de *Saccharum spp.*, utilizando lámparas fluorescentes y LED con 100% de iluminación.

de sobrevivencia a la aclimatación, en donde afirma que la luz LED roja es la más adecuada para la multiplicación de caña de azúcar y sugiere que las lámparas LED pueden ser buen sustituto de las lámparas fluorescentes de los laboratorios de micropropagación. En cuanto a la aclimatización de los explantes no hubieron diferencias entre las plantas micropropagadas bajo lámparas fluorescentes o lámparas LED.

## CONCLUSIONES

**Los resultados** globales del trabajo indican que la combinación de diversas metodologías descritas permite mejorar la multiplicación de caña de azúcar y tener reducción de costos y hacer más rentable el proceso de obtención de planta para siembra. En la primera etapa se duplicó la tasa de multiplicación de brotes (23 explantes) y disminuyó el tiempo de propagación a la mitad (15 días), evidenciando que la utilización de medio líquido (MLH) además de disminuir los costos de producción en 30%, aumenta la producción de plantas. No existen diferencias al utilizar lámparas fluorescentes y lámparas LED, favoreciendo la reducción de costos pues al disminuir el consumo de energía eléctrica los costos totales de producción disminuyen aproximadamente 50%.

## AGRADECIMIENTO

A la Línea de Investigación 5 (Biotecnología Vegetal Animal y Microbiana) del Colegio del Postgraduados, a la Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Campeche y a la Fundación Produce Campeche por los recursos económicos brindados para la realización de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Abdullahi B. Md., Shin-Yun-kyon, Turkey-Elshmary, Eun-Jung L., Kee-Yoeup P., 2011. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of Calanthe hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). Australian Journal of crop sciencie 5 (10): 1247-1254.
- Bongiovanni R. 2008. Economía de los cultivos industriales: algodón, caña de azúcar, maní, tabaco, té y yerba mate. Manfredi Córdoba. Primera edición, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina. 25 p.
- Caamal-Velázquez J.H., Bello-Bello J.J., Osnaya-Gonzalez M.L., Echeverría-Echeverría S.T., Guerrero-Turriza H.O., Criollo-Chan M.A. 2014. Manual de microporpagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) Colegio de Postgraduados y Fundación produce, 1ª edición, 23 p.
- Criollo-Chan M.A. 2013. Microporpagación de dos Variedades de Caña de Azúcar de Alto Rendimiento. Tesis de la Maestría en Agricultura Tropical, Colegio de Postgraduados Campus Campeche.
- Díaz I., Digonzelli P., Antoni H., Portas de Z., Cerrizuela E. 2001. Respuesta a diferentes densidades de plantación de mericlones y clones de la variedad de caña de azúcar CP 65-357. Rev. Fac. Agron. 18(1): 33-40.
- Escalona M., Lorenzo J.C., Gonzalez B., Daquinta M., González J.L., Desjardins Y., Borroto G.C. 1999. Pineapple (*Annanas comus* L. Merr) microporpagation in Temporary Inmersion systems. Plant Cell Reports 18: 743-748.
- Gomes da Rocha P.S., Pedroso de Oliviera R., Bueno Scivittaro W. 2013. Sugarcane microporpagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. Ciencia Rural, Santa Maria 43 (7): 1168-1173.
- Guerrero G. 1999. Cultivo herbáceos extensivos. 6 Edición. Editorial Mundi-Prensa, España. 350 p.
- Kodym A., Zapata-Arias J. 2001. Low-Cost alternative for the microporpagation of banana. Plant Cell Tissue and organ culture. 66, pp 67-71.
- Lorenzo J., González B., Escalona M., Teisson C., Espinosa P., Borroto C. 1998. Sugar canes shoot formation in an-improved temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ-Culture 54(3):197-200.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15(3):473-497.
- Parreño H.J.G. 2012. Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) variedad CP 72-2086. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Zamorano. Honduras. 30 p.
- Raghu A.V., Martin G., Priya V., Geetha S.P., Balachandran I. 2007. Low cost alternatives for the Microporpagation of *Centella asiatica*. Journal of plant science 2(6): 592-599.
- Salgado G., Bucio A., Riestra D., Lagunés E. 2001. Caña de azúcar: hacia un manejo sustentable. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. Instituto para el Desarrollo del Sistema de Producción del Trópico húmedo de Tabasco Villahermosa Tabasco. pp: 239-349.
- Singh B., Yadav G., Lal M. 2001. An Efficient Protocol for Microporpagation of Sugarcane Using Shoot Tip Explants. Sugarcane Research Institute, U.P. Council of Sugarcane Research, Shahjahanpur. India. 3(3):113-116
- Wu H.C., du Toit E. 2012. *In Vitro* Organogenesis of *Protea cynaroides* L. Shoot-Buds Cultured Under Red and Blue Light-Emitting Diodes, Embryogenesis, Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.), ISBN: 978-953-51-0466-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/in-vitro-organogenesisof-protea-cynaroides-l-shoot-buds-cultured-under-red-and-blue-light-emitting>.

