

EFFECTOS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO *IN VITRO* SOBRE LA CALIDAD DE LAS PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* sp. híbrido) PROPAGADAS EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL Y DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN.

Liuba Peñate¹; O. Concepción¹; R. Rodríguez¹; J.L. González¹; M. Escalona¹; M. Cid¹; D. Pina¹.

¹Lab. Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplasmas, Carretera a Morón Km. 9, UNICA, Ciego de Ávila, CP 69450. Cuba. FAX 53-33-266340.

lva@bioplasmas.cu

Resumen

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de tres condiciones de cultivo (autotrófica, mixotrófica y de mixotrofismo moderado) sobre el comportamiento morfo-fisiológico y bioquímico de plántulas de caña de azúcar propagadas en BIT y durante su posterior aclimatización. Se evaluaron indicadores morfológicos, fisiológicos y enzimas claves del metabolismo del carbono. Las plántulas que fueron sometidas a condiciones autotróficas no lograron sobrevivir debido al estrés propiciado por la ausencia de sacarosa en el medio de cultivo. Por esta razón no pudieron ser evaluadas. Los mejores resultados se obtuvieron para la condición de mixotrofismo moderado. En este caso, las variables morfológicas altura de las plantas, masa fresca y seca respondieron positivamente. La respuesta de la fotosíntesis neta fue mínima *in vitro* y aumentó notablemente a partir de la segunda semana de aclimatización. Para las plántulas con un desarrollo mixotrófico se observaron valores de transpiración y conductancia estomática muy elevados al inicio de la fase de elongación y durante la primera semana de aclimatización. Este grupo de plántulas se tardó más que el resto en lograr el control de la pérdida de agua y en alcanzar una estabilidad funcional. Las plantas que mostraron una mayor actividad de la PQ fueron las provenientes de condiciones mixotróficas. La FEPC tuvo un comportamiento totalmente inverso. Las actividades de la SS y la IN, al igual que la PQ, fueron superiores para las condiciones mixotróficas.

Palabras claves: *aclimatización, autotrofismo, inmersión temporal.*

Introducción.

Las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para el cultivo de la caña de azúcar. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, la búsqueda de otros métodos para la propagación *in vitro* continúa con el objetivo de incrementar los coeficientes de multiplicación y disminuir los costos, especialmente aquellos relacionados con la mano de obra (Bernal *et al*, 2002). En este sentido, una de las más novedosas tecnologías que se utilizan son los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).

El manejo de las condiciones de cultivo *in vitro* en los BIT juega un papel muy importante en la eficiencia del proceso de adaptación en la fase de aclimatización. Con ello se garantiza el desarrollo de plántulas que alcancen la calidad requerida para poder adaptarse en el menor tiempo posible a los cambios ambientales existentes en las casas de cultivo (Díaz *et al.*, 2004). Sin embargo, para la caña de

azúcar, aún se desconoce cual de estas condiciones posibilita plántulas con una mayor capacidad adaptativa y su influencia en la fase de aclimatización.

En este trabajo se determina el efecto de tres condiciones de cultivo *in vitro* (autotrófica, mixotrófica y de mixotrofismo moderado) en BIT sobre el comportamiento morfo-fisiológico y bioquímico de plántulas de caña de azúcar durante la fase de aclimatización.

Materiales y Métodos.

Como material vegetal se utilizó la especie *Saccharum* sp. híbrido, variedad C90-317. Los explantes iniciales para el cultivo *in vitro* se colectaron a partir de plantas élites adultas cultivadas y seleccionadas en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (EPICA) de Ciego de Ávila.

Durante la fase de elongación se ensayaron tres condiciones de cultivo *in vitro*: autotrófica, mixotrófica y de mixotrofismo moderado (Mix. Mod.) Las condiciones de cultivo que se establecieron se especifican en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de cultivo empleadas en los Biorreactores de Inmersión Temporal durante la fase de elongación.

Condición de cultivo <i>in vitro</i>	Luz ($\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	CO ₂ ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$)	Sacarosa (g.L ⁻¹)
Autotrófica	250	1 200	0
Mixotrófica	250	1 200	15
Mix. Mod.	80	375	30

La fase de aclimatización se desarrolló durante 42 d, según Rodríguez *et al.* (2003). Las bandejas empleadas poseían 52.5 cm de largo, 29.5 cm de ancho y 4.0 cm de alto con 144 pocillos. Las casas de cultivo mantenían una temperatura promedio según mediciones realizadas durante dos meses de 28 ± 1 °C, una humedad relativa de 90% y condiciones atmosféricas de concentración de CO₂ natural (375-400 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$) y de régimen de fotoperíodo luz-oscuridad correspondiente a los ciclos naturales.

Caracterización morfológica de las plantas propagadas en BIT durante la fase de aclimatización.

Se determinaron diferentes indicadores morfológicos: altura de las plantas (cm), masa fresca (g), masa seca (g) y número de hojas. Las evaluaciones se realizaron a los 0, 7, 21, 35 y 42 d durante la fase de aclimatización.

El porcentaje de supervivencia (%) se determinó por primera vez después de los 14 d de las plántulas ser transplantadas. Se continuaron realizando evaluaciones a los 21, 35 y 42 d de aclimatización.

Caracterización fisiológica de las plantas al inicio de la fase de elongación en BIT y durante su posterior aclimatización.

Los indicadores fisiológicos que se midieron para efectuar la caracterización fueron actividad fotosintética ($\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2}\text{s}^{-1}$), conductancia estomática ($\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y transpiración ($\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las evaluaciones se realizaron al inicio de la fase de elongación y a los 0, 7, 21, 35 y 42 d durante la fase de aclimatización.

Caracterización metabólica de las plantas al inicio de la fase de elongación en BIT y durante su posterior aclimatización.

Extracción y medición de la actividad enzimática para la Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (FEPC) (EC 4.1.1.31) y Piruvato Quinasa (PQ) (EC 2.7.1.40).

Las enzimas fueron extraídas según Siegel y Stitt (1990). La reacción catalizada por la FEPC se acopló con la reacción de la malato deshidrogenasa y se ensayó a 25 °C registrando la utilización de NADH a 340 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia). La reacción de PQ se acopló con la reacción de la lactato deshidrogenasa y se ensayó a 25 °C seguida por la utilización de NADH a 340 nm.

Extracción y medición de la actividad enzimática para la Sacarosa Sintasa (SS) (EC 2.4.1.13) e Invertasa Neutra (IN) (EC 3.2.1.26).

Las enzimas se extrajeron según el método descrito por Geigenberger y Stitt (1991). La actividad de la IN se determinó en una mezcla de reacción de 500 µL del volumen total que contiene enzimas libres de sales y 50 mmol L⁻¹ de sacarosa. Se utilizó un tampón (HEPES-KOH) a pH 7.5. La reacción se inició con la adición de la enzima, incubada previamente durante 20 min. a 30°C. La formación de hexosa se determinó enzimáticamente según la técnica descrita por Miron y Schaffer (1991).

La actividad de la SS se determinó por el mismo procedimiento descrito para las invertasas, pero con la adición de 10 µL de Uridin Difosfato (UDP) a 10 mmol L⁻¹ después que la reacción catalizada por la IN llegara a su completa verificación.

Las actividades enzimáticas se expresaron en µmol h⁻¹ g⁻¹ mf.

Resultados y Discusión.

Caracterización morfológica de plantas de caña de azúcar propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal durante la fase de aclimatización.

Las plántulas de caña de azúcar propagadas en BIT que crecieron bajo condiciones autotróficas no lograron sobrevivir. Es por ello que no fue posible realizarles ninguna de las evaluaciones determinadas para la caracterización morfológica durante la fase de aclimatización. La muerte de estas plántulas pudo estar relacionada con el estrés propiciado por la ausencia de sacarosa como fuente carbonada en el medio de cultivo.

Las plántulas que presentaron mayor altura fueron aquellas que crecieron bajo condiciones de mixotrofismo moderado. Sin embargo, para las condiciones mixotróficas el incremento de esta variable no se mostró hasta los 21 d (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de las condiciones de cultivo *in vitro* (mixotrofismo y mixotrofismo moderado) sobre las variables morfológicas evaluadas durante la fase de aclimatización de plántulas de caña de azúcar micropropagadas en BIT.

	días de evaluación	Altura (cm)			Masa Fresca (g)			Masa Seca (g)			No. Hojas		
		Mix.	Mod.	Mixotrófica	Mix.	Mod.	Mixotrófica	Mix.	Mod.	Mixotrófica	Mix.	Mod.	Mixotrófica
Aclimatiz.	0	15,23 d		14,88 d	0,35 e		0,34 e	0,40 d		0,40 d	4,1 c		3,8 c
	7	15,66 d		15,33 d	0,35 e		0,35 e	0,40 d		0,40 d	4,0 c		4,1 c
	21	26,80 c		16,85 d	5,03 c		3,29 d	0,53 c		0,41 d	6,2 b		5,8 b
	35	40,99 b		31,32 bc	7,07 b		4,88 c	0,73 b		0,53 c	6,2 b		6,0 b
	42	51,76 a		41,75 b	8,71 a		6,82 b	0,81 a		0,71 b	8,0 a		7,5 a

Medias con letras iguales no difieren significativamente (T- test, p>0.05). Los valores de la variable No. Hojas fueron transformados por la ecuación $x' = \sqrt{x}$.

Así como con la altura, los mayores valores de masa fresca y masa seca se obtuvieron en plántulas que crecieron bajo condiciones de mixotrofismo moderado. Por el contrario al comportamiento de las variables anteriores, el número de hojas por plantas, no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos. En este caso sólo se observaron nuevas emisiones foliares a partir de la segunda semana.

Caracterización fisiológica de las plantas al inicio de la fase de elongación en Biorreactores de Inmersión Temporal y durante su posterior aclimatización.

Al inicio de la fase de elongación no se apreció actividad fotosintética en las plantas sometidas a ambas condiciones experimentales evaluadas. Durante todo el proceso de aclimatización la respuesta de la fotosíntesis neta fue significativamente superior para las plántulas que tuvieron un desarrollo mixotrófico moderado (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de las condiciones de cultivo *in vitro* (mixotrofismo y mixotrofismo moderado) sobre las variables fisiológicas evaluadas al inicio de la fase de elongación y durante la aclimatización de plántulas de caña de azúcar micropropagadas en BIT.

días de evaluación	Fotosíntesis neta ($\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		Transpiración ($\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		Conductancia estomática ($\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
	Mix. Mod.	Mixotrófica	Mix. Mod.	Mixotrófica	Mix. Mod.	Mixotrófica
Inicio. elong	0,10 e	0,10 e	3,15 b	3,15 b	149,20 b	149,20 b
Aclimatiz.	0	0,32 e	0,25 e	2,78 c	4,32 a	129,37 c
	7	5,87 d	4,44 d	1,36 e	2,24 d	46,10 e
	21	13,16 b	7,68 c	1,65 e	1,56 e	89,33 d
	42	15,35 a	7,68 c	1,63 e	1,56 e	88,63 d

Medias con letras iguales no difieren significativamente (T- test, $p > 0.05$).

En la fase de elongación y hasta los 21 d de aclimatización la transpiración fue superior para las plantas que crecieron en un medio de cultivo con 15 g.L⁻¹ de sacarosa, las cuales alcanzaron los mayores valores al final de la fase de elongación. Por el contrario, para las plántulas que tuvieron un desarrollo mixotrófico los niveles de esta variable se estabilizaron a partir de los primeros siete días. Esto evidencia que dicho grupo de plántulas fue capaz de lograr el control de la pérdida de agua con mayor rapidez. Los datos de conductancia estomática confirman lo analizado anteriormente con relación al comportamiento de la transpiración.

Caracterización metabólica de las plantas al inicio de la fase de elongación en Biorreactores de Inmersión Temporal y durante su posterior aclimatización.

Extracción y medición de la actividad enzimática para la Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (FEPC) (EC 4.1.1.31) y Piruvato Quinasa (PQ) (EC 2.7.1.40).

Las plantas que mostraron una mayor actividad de la PQ fueron las provenientes de condiciones mixotróficas (Figura 1-A). Por el contrario, la actividad de la FEPC se identifica con sus mayores niveles en plantas que estuvieron sometidas a condiciones de mixotrofismo moderado (Figura 1-B). A los 42 d las plantas provenientes de un medio de cultivo con 1.5 g.L⁻¹ de sacarosa presentaron una actividad de la FEPC similar a la existente a los 21 d en las plántulas con 3.0 g.L⁻¹ de sacarosa. Esto indica que los procesos de fijación del CO₂ a través de la FEPC fueron más eficientes en estas plantas que en las primeras.

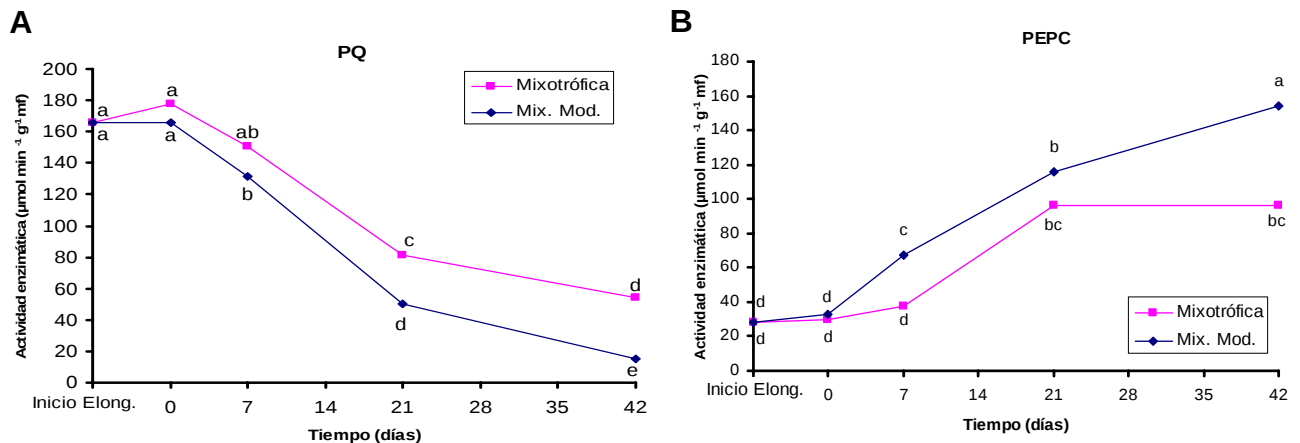


Figura 1. Comportamiento de la actividad enzimática al inicio de la fase de elongación y durante la aclimatación *ex vitro* de plántulas de caña de azúcar micropropagadas en BIT, de acuerdo a las condiciones de cultivo (mixotrófica y de mixotrofismo moderado) A) Piruvato Quinasa (PQ). B) Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (FEPC). Medias con letras iguales no difieren significativamente (T- test, $p > 0.05$)

Extracción y medición de la actividad enzimática para las Sacarosa Sintasa (SS) (EC 2.4.1.13) e Invertasa Neutra (IN) (EC 3.2.1.26).

La actividad enzimática de la SS y la IN tuvieron comportamientos muy semejantes (Figura 2-A y B). Ambas mostraron un aumento significativo en los primeros siete días de expuestas las plántulas a las condiciones de aclimatación, seguido de un descenso continuo a través de todo el proceso. La mayor actividad para ambos casos se observó en plántulas sometidas a condiciones mixotróficas.

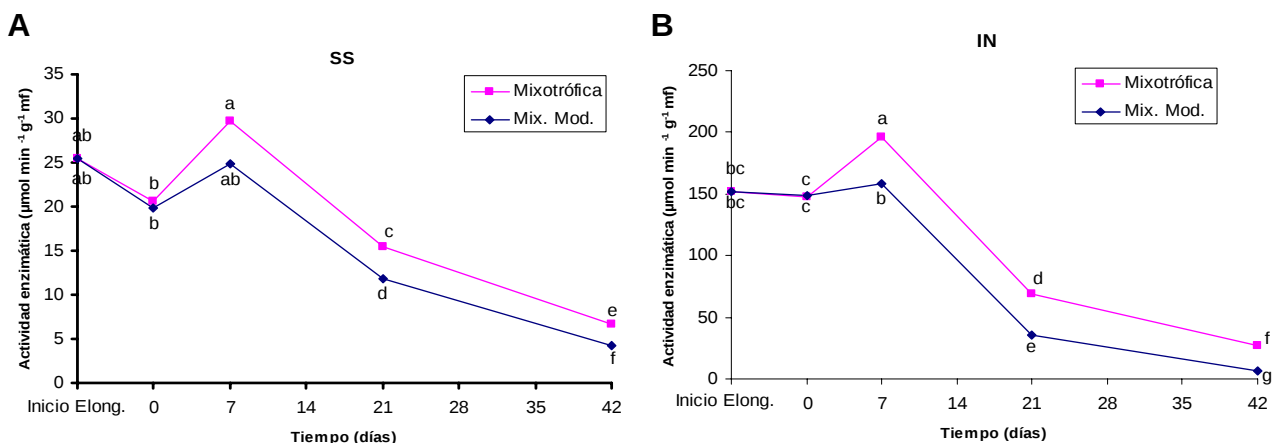


Figura 2. Comportamiento de la actividad enzimática al inicio de la fase de elongación y durante la aclimatación *ex vitro* de plántulas de caña de azúcar micropropagadas en BIT, de acuerdo a las condiciones de cultivo (mixotrófica y de mixotrofismo moderado) A) Sacarosa Sintasa (SS). B) Invertasa Neutra (IN). Medias con letras iguales no difieren significativamente (T- test, $p > 0.05$)

El comportamiento de la SS y la IN corrobora que la actividad respiratoria se vio más favorecida que los procesos fotosintéticos en los primeros días de aclimatación debido al estrés existente. Estos resultados están en correspondencia con los valores obtenidos de la PQ durante este período (Figura 1-A).