



**Contrato IG-CT-020**

**CENTRO DE  
INVESTIGACIÓN DE  
LA CAÑA DE AZÚCAR  
DEL ECUADOR**



**CINCAE**

**Una división de la  
FUNDACIÓN PARA LA  
INVESTIGACIÓN AZUCARERA  
DEL ECUADOR  
"FIADE"**

Publicación Técnica  
No. 1

# **MULTIPLICACIÓN MASIVA DE SEMILLA SANA DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**



**El Triunfo, Julio de 2003**





**Contrato IG-CT-020**



Publicación Técnica  
No. 1

Raúl O. Castillo, I.A., Ph. D.,  
Alexandra Gomez, I. A.,  
Freddy Garcés O., I. A.

## MULTIPLICACIÓN MASIVA DE SEMILLA SANA DE VARIETADES DE CAÑA DE AZÚCAR MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El Triunfo, Julio de 2003

### **CITA BIBLIOGRÁFICA:**

CASTILLO, R. O., A. GÓMEZ y F. GARCÉS. 2003. Multiplicación Masiva de Semilla Sana de Variedades de Caña de Azúcar Mediante Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador. El Triunfo, Ecuador. 12 p.

### **Producción:**

Programa de Variedades del CINCAE

### **Impresión:**

TECNIGRABA..

# MULTIPLICACIÓN MASIVA DE SEMILLA SANA DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Raúl O. Castillo, Alexandra Gómez y Freddy Garcés \*

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, constituye un variado grupo de técnicas, mediante la cual un trozo de planta, denominado "explante", se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida, conocido como medio de cultivo. Este tiene todos los elementos nutricionales esenciales para el crecimiento de una planta, bajo condiciones ambientales controladas. La temperatura, luminosidad, humedad relativa, y el medio de cultivo dependerá de la especie y el objetivo perseguido: Así por ejemplo, para la multiplicación masiva de caña de azúcar se utiliza un medio básico con los elementos nutritivos mayores y menores, carbono o elemento energético como la sacarosa, ciertas hormonas de crecimiento, vitaminas y elementos antioxidantes.

El cultivo de tejidos, es una herramienta complementaria para establecer sistemas de multiplicación masiva de variedades de caña de azúcar libres de enfermedades sistémicas. Además, puede ayudar a proporcionar miles de plantas en forma rápida y de alta calidad. En caña de azúcar el cultivo de tejidos se usa como complemento de los sistemas de tratamiento de agua caliente y termoterapia.

En forma general, el tratamiento de agua caliente ha sido usado para la limpieza de patógenos causantes de enfermedades como el raquitismo de la soca (*Clavivacter xyli* subsp. *xyli* Davis *et al*), clasificada actualmente dentro del género *Leifsonia* (Hoy y Flynn, 2001), y la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson), (Victoria, Guzmán y Angel, 1995). Este tratamiento conjuntamente con la termoterapia y cultivo de meristemos permite la limpieza de enfermedades causadas por virus, como el mosaico (SCMV), y el síndrome de la hoja amarilla (Sugarcane Yellow Leaf Virus, SCYLV) (Victoria, et al., 1997). Ataques severos de éstas enfermedades pueden disminuir la producción entre el 15 al 35%, dependiendo de la enfermedad (Victoria, Guzmán y Angel, 1995). Todas ellas están ampliamente distribuidas en Ecuador (Garcés y Valladares, 2001, Garcés, 2003).

La transmisión de las mismas tanto en la semilla como entre los canteros comerciales se produce con mucha facilidad, ya que se disponen de vectores (áfidos principalmente) y a través del machete, durante el corte de la caña. Si bien el sistema de multiplicación por yemas tratadas con agua caliente y fría en movimiento, ha mostrado una alternativa para la limpieza de raquitismo y escaldadura, no se observa eficiencia para la limpieza de virus.



Figura 1. Yemas tratadas en agua caliente y siembra en camas de germinación

\* R. Castillo, Director Programa de Variedades del CINCAE, A. Gómez, Técnico del Proyecto PROMSA y F. Garcés, Fitopatólogo del CINCAE

## METODOLOGÍA DE MULTIPLICACIÓN

### 1. Tratamiento en agua caliente:

El sistema de multiplicación *in vitro* en caña de azúcar, se inicia con el corte de yemas provenientes de tallos de caña de 8 a 10 meses de edad. Las yemas se obtienen con una máquina "saca yemas" o "sacabocados", que solamente corta un trozo de 3.5 cm de largo tipo corcho, con poca cantidad de tejido del tallo, que protege a la yema (Figura 1). Posteriormente, las yemas son tratadas en agua caliente a 51°C por 1 hora (Victoria, et al, 1997). Para incentivar una buena germinación, se puede realizar un pre-tratamiento colocando las yemas en agua caliente a una temperatura de 50°C por 10 minutos, se dejan reposar por 8-12 horas y luego se realiza el tratamiento. Las yemas tratadas se sumergen en una solución de Vitavax 300 en dosis de 5 gramos por litro de agua, para evitar el ataque de hongos del suelo posteriormente. Se colocan en una platabanda de germinación con sustrato compuesto por ceniza y cachaza (relación 3:1 respectivamente), luego de 15 días son trasplantadas a vasos de icopor, con un sustrato rico en materia orgánica (Figura 2).

### 2. Termoterapia:

Cuando las plantas en el vaso de icopor han desarrollado suficientes raíces lo que generalmente ocurre luego de 10 días, se colocan por 21 días en una incubadora que proporciona una temperatura de 40°C y 12 horas de luz, a la que se denomina cámara de termoterapia (Figura 2). Bajo estas condiciones ambientales, las plantas tienen un crecimiento acelerado del tejido apical, produciendo células libres de patógenos. Durante este periodo, la mayoría de los virus, bacterias y hongos son eliminados y los tejidos meristemáticos de la parte apical están listos para ser extraídos y sembrados en un medio nutritivo de establecimiento.



Figura 2. Cámara de termoterapia y planta en vaso de icopor para tratamiento.

### 3. Extracción del meristemo y medios de cultivo:

Siendo el meristema apical la región de mayor crecimiento, las células nuevas escapan a la presencia de virus. Por ello el meristema que se extrae es lo más pequeño posible, alcanzando unos 2 mm de largo con dos primordios foliares. Este meristemo se extrae asépticamente, bajo una cámara de flujo laminar horizontal, con la ayuda de un estereo microscopio (Figura 3). Se coloca en medio de cultivo I basado en las sales de Murashige y Skoog (1962) (MSI) (Cuadro 1) o medio de establecimiento, que le permite crecer (elongarse) bajo oscuridad y en agitación. Luego de 15 días, este meristemo se coloca en el medio de multiplicación denominado MSII (Cuadro 1). Este medio rico en citoquininas, provoca una proliferación de tallos laterales, cuyo número dependerá de la variedad. Generalmente la multiplicación tiene una relación de 1 a 10 tallos. Este proceso se puede repetir hasta obtener varios tallos laterales, que pasarán al medio de enraizamiento o MSIII con contenidos de auxinas y una reducción de las citoquininas (Cuadro 1). Generalmente se recomienda realizar máximo 4 ciclos de multiplicación, debido a que se podría provocar variaciones somaclonales, que provocan cambios de coloración de tallos o deformaciones de las hojas, así como albinismos indeseados.



Figura 3. Cámara de extracción de meristemos y frasco con plantitas en medio de multiplicación

El medio de cultivo de multiplicación, permite obtener rápidamente un número adecuado de tallos laterales, que serán las próximas plantitas para seguir multiplicando hasta obtener un número adecuado de plantas para trasplante a gaveta y luego a campo. Las tasas de multiplicación depende de la variedad, es así que las observaciones realizadas en CINCAE, muestran que la variedad Ragnar tiene una tasa de multiplicación de 1:10, mientras que la PR 671070 presenta una relación de 1:27. La mayoría de variedades producen un promedio 10 a 12 tallos por cada meristemo

extraído.

Cuadro 1. Medios de cultivo usados para propagación de caña de azúcar en CINCAE, Ecuador

COMPONENTES*	CANTIDAD DE MEDIO POR LITRO		
	ESTABLECIMIENTO MSI	MULTIPLICACIÓN MSII	ENRAIZAMIENTO MSIII
Sales de Murashige & Skoog (g)	4.3	4.3	4,3
<b>Reguladores:</b>			
AG <sub>3</sub> (mg)	0.1	-	-
BAP (mg)	-	0.2	-
KIN (mg)	0.1	0.1	0.1
ANA (mg)	-	-	5.0
<b>Componentes orgánicos:</b>			
Tiamina -HCl (mg)	1.0	1.0	1.0
Mio-Inositol (mg)	100	100	100
<b>Otros componentes:</b>			
Acido cítrico (mg)	150.0	-	-
Sacarosa (g)	20.0	20.0	40.0
pH	5.7	5.7	5.7

\* Información proporcionada por A. Sanguino, COPERSUCAR-Brasil, 2001

Para certificar la sanidad de las plantas obtenidas por este sistema conocidas como vitroplantas, es necesario contar con **técnicas de diagnóstico** rápidas y eficientes o sensibles. Para la bacteria causante de la escaldadura de la hoja (LSD), se usa la metodología llamada "Colony Dot Blot Inmunoassay" (CDBIA). Mientras que, para la bacteria causante del raquitismo de la soca (RSD), se puede diagnosticar usando la prueba de "Dot Blot Inmunoassay" (DBIA). En el caso de los virus causantes del síndrome de la hoja amarilla y el Mosaico de la Hoja se emplea la técnica denominada "Tissue Blot inmunoassay" (TBIA) y DAS-ELISA (Guzmán y Victoria, 2000; Shenck, Hu y

Lockhart, 1997). Este diagnóstico se realiza antes de iniciar el proceso y durante las primeras etapas de multiplicación, así como las evaluaciones periódicas en campo.

#### 4. Endurecimiento y trasplante a gavetas

Cuando el medio de cultivo de enraizamiento presenta plantas con suficiente número de tallos laterales y con raíces funcionales, se procede a trasplantar a bandejas o camas para su "endurecimiento" o adaptación a suelo. Aquí se usan sustratos que pueden ser suelo orgánico o arena, cualquiera de los sustratos deben ser pasteurizados para evitar contaminaciones. Las plantas deben ser colocadas con suficiente humedad, en un ambiente de temperatura moderada entre los 25 a 35°C y humedad relativa alrededor del 90%. Si el invernadero es grande, se debe cubrir las plantitas con plástico para evitar su deshidratación. Es importante que al sustrato se proporcione los nutrientes necesarios para un normal desarrollo de las plantas. Generalmente se pueden aplicar fertilizantes que son usados en cultivos hidropónicos. Luego se adicionan fertilizantes con buenas concentraciones de nitrógeno para desarrollar tallos y área foliar. Durante el endurecimiento de las plantitas, se debe cubrir con plástico y sobre éste una cubierta de polisombra o "Saram" del 60%.

Cuando las plantitas presenten un sistema radicular fuerte, es decir luego de 2 a 3 semanas, se trasplantan a gavetas (Figura 4) donde permanecerán por dos meses antes de ser trasplantadas a campo. Durante este tiempo desarrollarán suficientes raíces y los tallos tendrán suficiente vigor para establecerse en campo y continuar su crecimiento. Estas gavetas deberán colocarse suspendidas en alambre grueso galvanizado en el aire formando terrazas o mesas hasta el trasplante. Esto evita la salida de raíces por los orificios de las gavetas. Durante este tiempo se debe proporcionar suficiente riego (dos o tres veces por día) y las plantas se deberán podar o cortar las hojas superiores a los 20 y 40 días.



Figura 4. Gavetas con plantas provenientes de cultivo de tejidos listas para trasplante a campo

#### 5. Trasplante a campo

Una vez que han transcurrido los 60 días en las gavetas, las plantas han formado un buen sistema radicular, se trasplantan a campo. Se puede usar un sistema parecido a la siembra comercial, en surcos distanciados a 1.50 m, colocando plantas individuales a 70 cm entre ellas. Estas distancias permiten sembrar unas 9523 plantas por hectárea. El trasplante se puede hacer a máquina cuando el suelo está completamente suelto. La falta de máquinas sembradoras hacen que la siembra manual se realice usando un tipo de "espeque" o haciendo pequeños huecos en el suelo donde se deposita la plantita y se cubre con suelo hasta la unión del tallo con las raíces primarias. Para facilitar un buen prendimiento se deberá presionar el suelo alrededor de la planta.

El día anterior al trasplante, se debe proceder a regar las plantas en las gavetas para que su sistema radicular esté húmedo y no sufran un exagerado estrés. Esta labor ayuda también a desprender las plantas de la gaveta fácilmente. El campo donde se va a proceder a plantar el semillero también deberá ser regado con unos dos días de anticipación para que exista suficiente humedad en el suelo.



Luego del trasplante, se debe regar por gravedad para mantener una adecuada humedad del suelo. Los riegos posteriores dependerán de las condiciones del suelo y las frecuencias serán igual que una siembra comercial. La fertilización para un semillero debe ser controlado eficientemente y de acuerdo a los análisis del suelo. Generalmente, se debe aplicar los principales elementos como son el nitrógeno, fósforo y potasio. En el caso de fósforo y potasio, éstos deberán ser adicionados al momento de la siembra y en el fondo del surco. El nitrógeno debe aplicarse en dos partes, la primera mitad a los 30 días y la segunda a los 90 días luego de la siembra.

## 6. Establecimiento de semilleros limpios y manejo de cultivo en campo

Las parcelas destinadas para la multiplicación de semilleros provenientes de cultivo de tejidos deberán estar aislados de campos contaminados con enfermedades sistémicas, para evitar una inmediata contaminación. Igualmente, los lotes que se destinarán a semilleros deberán ser limpios de cosechas anteriores, que garanticen la pureza varietal (Castillo, 2003). Por ello se recomienda que sean lotes de barbecho de buen suelo y con acceso a riegos y drenajes. Las plantas que han pasado por el proceso de limpieza deben ser manejadas como un semillero de fundación. Es decir, deben tener un mejor manejo



Figura 5. Plantas provenientes de cultivo de tejidos sembradas en semilleros de fundación.

que un cantero comercial. Esta será la fuente de semilla para los semilleros básicos y luego comerciales (Figura 5). Estos últimos semilleros servirán para producir la semilla requerida para las siembras comerciales.

Una vez que se ha establecido el semillero, los riegos y el control de malezas será igual que un cantero comercial. Con respecto a plagas, se deberá hacer una revisión periódica del cultivo a fin de hacer los controles oportunos y necesarios.

## 7. Corte del semillero

Siendo el semillero la primera fuente de material de multiplicación, llamada semilla de fundación, éste debe ser manejada adecuadamente. Se debe cuidar de contaminaciones con los microorganismos que fueron eliminados durante el proceso descrito anteriormente. El corte debe hacerse con machetes desinfectados en una solución de amonio cuaternario al 1% durante 5 a 10 segundos. Con los cuidados respectivos, los tallos sanos producirán semilla de mejor calidad, facilitando así la multiplicación rápida de una variedad. Se puede continuar con la multiplicación de yemas, cuya tasa de multiplicación ayudará a establecer rápidamente nuevos semilleros. Si se usa el sistema convencional, se esperaría obtener semilla en una tasa de 1 a 10 ha, en cambio usando el método de yemas se podría aumentar en proporción de 1 a 60 u 80, es decir de una hectárea de semilla se puede multiplicar material para sembrar 60 u 80 hectáreas.

## Referencias Bibliográficas

- Castillo, R. O. 2003. Variedades de Caña de Azúcar en Ecuador. En: Memorias del Curso sobre Caña de Azúcar. AETA. Guayaquil, Ecuador. Pp. 14-30.
- Garcés, F. 2003. Manejo preventivo de los principales problemas fitopatológicos en Ecuador. En: Memorias del Curso sobre Caña de Azúcar. AETA. Guayaquil, Ecuador. Pp. 47-75.



- Garcés, F. y C. Valladares. 2001. Diagnóstico del síndrome de la hoja amarilla en el Ecuador. Carta Informativa CINCAE Año 3, No. 6: 6-16.
- Guzmán, M. L. y J. Victoria. 2000. Desarrollo de técnicas para el diagnóstico de la caña de azúcar. En: Memorias del V Congreso de TECNICAÑA. Cali, Colombia.
- Hoy, J.W. and J. L. Flynn. 2001. Control of ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with seedcane produced through micropropagation and resistant cultivars. En: Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technologists 24: 417-421
- Shenck, S.; J. S. Hu y B. E. Lockhart. 1997. Use of tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. En: Sugar Cane (4):5-14.
- Victoria, J.; Guzmán, M. L. y Angel, J. C. 1995. Enfermedades de la Caña de Azúcar en Colombia. En: El Cultivo de la Caña de Azúcar en la Zona Azucarera de Colombia. CENICAÑA. Cali, Colombia. Pp 265-294.
- Victoria, J.; C. Viveros; C. Cassalet y H. Calderón. 1997. Establecimiento de Semilleros Limpios. CENICAÑA. Cali, Colombia 20 p.