

PROTOCOLO PARA LA REPRODUCCIÓN MASIVA *IN VITRO* DE CAÑA DE AZÚCAR EN COSTA RICA.

Erick Chavarría

Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA - LAICA).

Bolívar Jiménez

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Granja Modelo, Instituto Nacional de Aprendizaje (INA)

Fernando Yeh

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Granja Modelo, Instituto Nacional de Aprendizaje (INA). ³Misión Técnica de la República de China de en Costa Rica.

✓ **Fase de recolección de material vegetal en el campo:**

La sección de la planta que es más factible de utilizar como fuente de explantes es el ápice, que es el tejido que da origen a las hojas y al tallo, y se encuentra localizado el meristemo apical.

El ápice se encuentra ubicado dentro del verticilo caulinar de la planta, esto hace que su condición aséptica sea bastante buena, permitiendo que el riesgo de contaminación en la fase siguiente sea mínimo.

Es fundamental asegurar que los explantes provengan de plantas en buenas condiciones y libres de patógenos virales y bacterianas, para evitar la propagación de estas enfermedades.

✓ **Fase de iniciación**

Luego de obtener el material en el campo, se procede a extraer el ápice del verticilo en un medio totalmente aséptico. Posteriormente se siembra en un medio de cultivo artificial de Murashige y Skoog (MS).

Este medio es totalmente líquido, por lo que debe mantenerse estrictamente en agitación constante a 75 rpm con una órbita de 1". Esto facilita el intercambio de O₂, evitando la asfixia de las células del tejido del explante por la falta de intercambio gaseoso en el medio.

El medio MS líquido permite que la oxidación producida por la liberación de fenoles del explante, se distribuya en todo el medio evitando su muerte.

Esta etapa dura aproximadamente de 3 a 6 semanas y depende de la respuesta del explante que es influenciada por la variedad de caña.

Si la oxidación es muy fuerte, es necesario realizar cambios del medio de cultivo incluso después de 1 semana de sembrado el explante.

✓ **Fase de multiplicación:**

Una vez que el explante superó la etapa de iniciación, éste comienza a crecer y a producir brotes laterales formando pequeñas cepas dentro de los frascos de cultivo; iniciando así la etapa de multiplicación, que consta de la separación de los nuevos brotes para ser trasladados a medios de cultivo MS semi sólidos.

Cada 2 a 3 semanas deben realizarse los trasplantes debido a que la caña crece muy rápido, lo que hace que los medios MS se agoten con mucha facilidad por lo que luego de 4 semanas es posible observar que algunos tallos comienzan a morir debido a la competencia y a la falta de oxígeno existente en el medio.

Durante esta etapa la caña puede sufrir los efectos de variación somaclonal *in vitro*, debido a cambios en la integridad genética de los individuos por la aparición de yemas adventicias, producidas por el estímulo de altos niveles endógenos de citoquininas a nivel celular, que incitan a la diferenciación de grupos de células para la producción de tallos. Por su condición y origen estas yemas provienen de células genéticamente inestables que podrían inducir cambios en las poblaciones que se quieren reproducir.

Para evitar este efecto negativo, es recomendable no abusar de los subcultivos, por lo que al sobrepasar el décimo quinto trasplante los riesgos de obtener variación somaclonal aumentan.

^{1/} **En: Participación de DIECA en el XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA, julio. 1999. p:117-118.**

✓ **Fase de enraizamiento:**

Aquí los tallos deben ser seleccionados, escogiendo los que presentan más vigor y tamaño. Aquellos que no califican para enraizamiento se colocan en medio MS de multiplicación para su aprovechamiento posterior, esto hace que las etapas de multiplicación y enraizamiento se realicen en forma simultánea.

En pruebas realizadas se pudo determinar que el trasplante posterior de un solo tallo por frasco a medio de multiplicación antes del enraizamiento, estimula la producción de tallos más homogéneos y fuertes, los que son ideales para esta etapa.

Esta fase tiene una duración de 3 semanas.

✓ **Fase de aclimatación:**

Las plantas enraizadas que se encuentran dentro del laboratorio bajo condiciones asépticas y estrictamente controladas, deben ser sacadas al exterior para ser plantadas en bandejas con un sustrato formado por la mezcla de arena, suelo y abono orgánico en proporciones iguales.

Esta etapa prepara a la nueva planta para un cambio fuerte en su anatomía y en sus funciones metabólicas. Las plantas *in vitro* se encuentran en un ambiente de 100% de humedad relativa (HR) en el cual todos los nutrimentos le son suministrados artificialmente. Ellas deberán cambiar a un ambiente con una menor HR y en donde deben absorber el agua y sintetizar los nutrimentos necesarios para su desarrollo.

Esta fase se lleva a cabo en un aclimatador, que evita la deshidratación de las plantas. Conforme transcurre el tiempo, la HR se disminuye paulatinamente hasta alcanzar el equilibrio con el ambiente. Este proceso puede alcanzar de 3 a 6 semanas.

✓ **Fase de preparación del almácigo:**

Una vez que las plantas están debidamente aclimatadas, se procede a preparar las plantas para su traslado definitivo al campo, siempre bajo condiciones controladas en invernadero.

El procedimiento consiste en brindar a las nuevas plantas las condiciones necesarias para que crezcan en tamaño, produciendo mayor follaje y raíces que permitan a la planta soportar el trasplante definitivo al campo.

✓ **Fase de siembra definitiva:**

Ésta se lleva a cabo en el campo una vez que el terreno esté debidamente preparado. Las plantas deben transplantarse a una distancia que va de 0,5 a 1 m entre plantas y 1,5 m entre surcos.

Una vez establecido el semillero, se deben seguir todas las prácticas agronómicas que todo semillero básico requiere.

Componentes	Cantidad por litro de medio		
	Iniciación	Multiplicación	Enraizamiento
SALES Y VITAMINAS DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)	Dosis completa	Dosis completa	Dosis completa
NaH ₂ PO ₄	170 mg	170 mg	170 mg
REGULADORES DE CRECIMIENTO:			
Ácido Naftalenacético			10,0 mg
Ácido Giberélico (AG ₃)	0,1 mg		
Bensiladenina (BA)	0,2 mg	0,2 mg	
Kinetina	0,1 mg	0,1 mg	
OTROS COMPONENTES:			
Agua de coco	150 ml		
Sacarosa	20 g	20 g	40 g
Gel Rite		1,0 g	1,0 g
pH del medio	5,7	5,7	5,7