

VIII. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.)

Isidro E. Suárez¹ e Iván Javier Pastrana Vargas²

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe IBAC

²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA

INTRODUCCIÓN

Todo programa de mejoramiento genético vegetal tiene como base aumentar la variabilidad genética, seleccionar genotipos superiores a partir de esta base genética y conservar un rango de genotipos que permita en determinado momento reiniciar o continuar el proceso de mejoramiento genético.

Para especies con semillas ortodoxas, la conservación de germoplasma a través de semillas reduce costos debido a una mayor

eficiencia de espacio y manejo del material a conservar; mientras que especies con semillas recalcitrante, o que no producen semillas, la conservación de germoplasma debe hacerse a de manera obligatoria a través de plantas propagadas de partes vegetativas (*in vivo*) que garanticen el genotipo y la perpetuación de este en la propagación.

Bajo condiciones normales, el mantenimiento de germoplasma en condiciones *in vivo* genera costos considerables

representados en el cultivo de las plantas, el uso de terrenos generalmente de gran valor y la siembra periódica en especies bianuales; adicionalmente, en las colecciones *in vivo* se aumenta el riesgo de pérdida del material por el deterioro progresivo de las plantas, el ataque de agentes bióticos y la amenazas de desastres naturales (Suárez 2003; Suárez 2020).

El almacenamiento de germoplasma en condiciones *in vitro* es una alternativa a las limitantes de la conservación de germoplasma *in vivo* debido a que reduce los altos costos por espacio, el material se encuentra libre de plagas y enfermedades, y se disminuyen los riegos por desastres ambientales al no haber exposición directa con el medio ambiente natural.

Existen diversas formas de almacenar ger moplasm a en condiciones *in vitro*. La crioconservación consiste en el almacenamiento de

tejidos vegetales a ultrabajas temperaturas ($<-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), las cuales se pueden lograr con refrigeradores, el uso de dióxido de carbono sólido, y el nitrógeno líquido.

Otro método alternativo de conservación de germoplasma *in vitro* es a través del cultivo lento, el cual consiste en el almacenamiento de tejidos vegetales en formulaciones de medios de cultivo modificadas con el objetivo de reducir las tasas de crecimiento y multiplicación sin atender contra la supervivencia del material. Estas modificaciones de los medios pueden consistir en la disminución de las cantidades de fuentes energéticas (Carbohidratos), reducción de la concentración de las sales o la adición de reguladores de crecimiento que disminuyen el desarrollo de los órganos. En el presente estudio se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa y sales minerales en la conservación *in vitro* de caña flecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los explantes consistieron de segmentos de tallo (1 – 1.5 cm de longitud) con yemas axilares, obtenidos de plantas de caña flecha cultivar “Criolla” establecidas en condiciones *in vitro*, las cuales fueron cultivadas durante seis meses en un medio semisólido MS suplementado con (en mg l⁻¹) myo inositol (100), tiamina HCl (0.4) y agar (7000) (Sigma®). El pH del medio fue ajustado entre 5.7 – 5.8 con KOH o HCl previo a la adición del agente solidificante, posteriormente esterilizado en un autoclave a 121 °C y 1.1 kg cm⁻² por 20 minutos y vertido en recipientes de vidrio. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura promedio de 25 °C con 12 horas diarias de luz a una intensidad de 40 μmol m⁻¹ s⁻¹ aproximadamente.

Efecto diferentes concentraciones de medio MS y sacarosa en la conservación *in vitro* de cultivos de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.)

Los explantes fueron establecidos independientemente en frascos de vidrio de 250 cm³ de capacidad conteniendo 30 ml de medios MS (Murashige y Skoog 1962) semisólido a diferentes concentraciones de sales y suplidos con cantidades variadas de sacarosa (Tabla 15).

Tabla 15. Tratamientos evaluados en la conservación *in vitro* de plantas de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.).

Tratamiento	Medio
1	MS + 30 g de sacarosa
2	MS + 15 g de sacarosa
3	MS + 60 g de sacarosa
4	½MS + 15 g de sacarosa
5	½MS + 60 g de sacarosa
6	¼MS + 15 g de sacarosa
7	¼MS + 60 g de sacarosa

Los cultivos fueron almacenados a una temperatura promedio de 25 °C con 12 horas diarias de luz a una intensidad de 40 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ durante 12 meses después de los cuales se registró el porcentaje de supervivencia y se evaluó el número de nuevos brotes producidos por cada explante, la longitud de los brotes producidos, el número y la longitud de las raíces.

Preparación de medios y diseño experimental

El pH de todos los medios fue ajustado entre 5.7 – 5.8 con KOH o HCl previo a la adición del agente solidificante, posteriormente esterilizado en un autoclave a 121 °C y 1.1 Kg cm^{-2} por 20 minutos y vertido en recipientes de vidrio. Los tratamientos fueron distribuidos con un diseño completamente al azar, donde cada unidad experimental correspondió a un explante establecido en un recipiente, y cada tratamiento fue replicado 30 veces. Los datos colectados fueron procesados

con un análisis de varianza utilizando el modelo estadístico $Y_{ij} = \mu + a_i + b_j + \epsilon_{ij}$; donde μ es el promedio general, i representa el efecto de las formulaciones de medios de cultivo, j el efecto de las cantidades de sacarosa y ϵ_{ij} es efecto del error experimental. Los promedios fueron separados con la prueba de múltiples rangos de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de caña flecha cultivadas en los diferentes tratamientos mostraron características de crecimiento diferentes de acuerdo con los tratamientos aplicados (Figura 19). Los datos colectados a los 12 meses después del establecimiento de los cultivos en condiciones *in vitro* muestran que ninguno de los tratamientos evaluados indujeron porcentajes completos (100%) de supervivencia (100%) o mortalidad inferior al 70% (Tabla 16). Los mayores



Figura 19. Planta de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) Var “Criolla” mostrando los efectos del almacenamiento después de un año en MS + 30 g sacarosa (Izquierda) y ¼ MS + 15 g sacarosa (Derecha)..

porcentajes de supervivencia se observaron en los explantes que fueron cultivados en ¼MS + 60 g de sacarosa (96.66%) y aquellos cultivados en presencia de ¼ MS + 15 g de sacarosa (93.33%), mientras que aquellos cultivados en presencia de MS + 30 g de sacarosa y ½MS + 15 g de sacarosa sufrieron la mayor tasa de mortalidad (30%) (Tabla 16).

Los tratamientos evaluados afectaron cuantitativamente

Tabla 16. Efecto de diferentes concentraciones de sales MS y sacarosa sobre la supervivencia y crecimiento de cultivos de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) a los 12 meses después del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de raíces	Longitud de raíz (cm)
MS + 15 g de sacarosa	73.33	3.21 BC	3.21 B	4.25 D	1.87 B
MS + 30 g de sacarosa	70.00	3.03 C*	4.53 AB	5.08 CD	2.82 B
½MS + 15 g de sacarosa	70.00	3.05 C	3.90 B	5.70 CD	2.21 B
MS + 60 g de sacarosa	93.33	5.37 A	5.5 B	7.13 BCD	4.07 B
¼MS + 15 g de sacarosa	93.33	4.23 ABC	6.46 A	10.65 AB	3.35 B
½MS + 60 g de sacarosa	83.33	5.17 AB	6.27 A	9.42 BC	4.20 B
¼MS + 60 g de sacarosa	96.67	5.87 A	5.74 AB	14.10 A	12.29 A

* Valores con la misma letra son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

los procesos de formación de órganos en los explantes cultivados. El análisis de varianza permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($Pr < 0.0001$) con respecto a las variables número promedio de nuevos brotes, longitud de nuevos brotes, número promedio de raíces por explante y longitud de raíces por explante.

El análisis de separación de medias mostró que los tratamientos MS + 30 g de sacarosa y $\frac{1}{2}$ MS + 15 g de sacarosa indujeron las menores tasas de formación de nuevos brotes por explante, mientras que los tratamientos MS + 60 g de sacarosa y $\frac{1}{4}$ MS + 60 g de sacarosa incrementaron de manera significativa la tasas de multiplicación de nuevos brotes a partir de los explantes (Tabla 16). Los mismos datos permiten observar una tendencia hacia una mayor producción de nuevos brotes cuando la cantidad de sacarosa en el medio es de 60 g l^{-1} . Esta tendencia no se conserva

en la variable longitud de brotes, donde no existe una asociación entre los valores resultantes con la concentración de sacarosa o sales.

En cuanto a la formación de raíces, no se observa un patrón definido de comportamiento como respuesta a las diferentes concentraciones de sales, mientras que las mayores longitudes de raíces se observan en cultivos mantenidos en medios con un suplemento de 60 g de sacarosa sin alcanzar diferencias significativas (Tabla 16).

La conservación de germoplasma es una actividad vital para la supervivencia de especies en peligro de extinción. La caña flecha puede ser una de las especies que integre la lista de especies amenazadas en su supervivencia, si no se toman medidas urgentes que contrarresten la pérdida de poblaciones naturales (Araméndiz *et al.*, 2005).

Debido a los bajos costos y mayores niveles de seguridad, la conservación de germoplasma en condiciones *in vitro* es una de las estrategias preferidas para la conservación de recursos genéticos vegetales (Suárez 2003; Suárez 2020). La información obtenida en el desarrollo del presente trabajo ha demostrado que es posible conservar clones de caña flecha en condiciones *in vitro*, disminuyendo tanto el suministro de las fuentes energéticas como la concentración de sales en el medio, hasta por un año, sin afectar su supervivencia y conservando la capacidad de multiplicación. Los datos colectados permiten inferir que el cultivo de brotes obtenidos a partir de plantas cultivadas *in vitro* en un medio MS reducido a $\frac{1}{4}$ de su concentración de sales y una concentración de 15 g de sacarosa permite alcanzar porcentajes de supervivencia superiores al 90%, con una reducción importante de costos debido a la disminución en el uso de insumos y las labores de

subcultivo del material durante 12 meses.

La conservación de germoplasma mediante el uso de cultivo lento de tejidos vegetales en condiciones *in vitro* ha sido una tecnología aplicada en la conservación de diferentes especies vegetales involucrando el manejo de variables como las cantidades de insumos en el medio (cultivo lento) y el grado de temperatura (crioconservación). Efendi *et al.* (2001) reportaron la crioconservación de tejidos embriogénicos de aguacate y su posterior regeneración en plantas. García *et al.* (2004) evaluaron el efecto de la temperatura y diferentes cantidades de manitol en el medio sobre la conservación *in vitro* de germoplasma de caña de azúcar, reportando la mayor supervivencia y calidad de los cultivos a 15 °C en presencia de 10 g l⁻¹ de manitol. En otro estudio con fuentes alternativas de carbohidratos, Montalvo-Peniche *et al.* (2007) observaron que los mejores resultados en la

conservación de germoplasma de *Chile Habanero* en condiciones *in vitro* ocurrió en presencia de 2% de sorbitol. Iriondo y Pérez (2002) almacenaron meristemos de *Ipsea malabarica* durante 20 meses en un medio ½ MS sin suministro de carbohidratos.

El almacenamiento a períodos de tiempo superiores a los experimentados en el presente estudio también han sido evaluados, aunque los resultados sugieren poca conveniencia en algunos casos. Reed (2002) conservó *in vitro* meristemos de fresa observando que los mejores resultados fueron observados a los 9 y 12 meses, con una disminución marcada en la supervivencia y calidad de los cultivos al extenderse hasta los 19 meses; no obstante, es necesario evaluar la posibilidad de almacenar caña flecha por períodos de tiempo superiores a un año, al igual que determina el efecto de las variaciones en el fotoperíodo, diferentes grados de temperatura y uso de reguladores de crecimiento en la supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Aramendiz H, Espitia M y Robles J. 2005. Colección, conservación, caracterización morfoagronómica y producción de semilla de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) del Caribe Colombiano. CIUC, Universidad de Córdoba, Montería, 118p.
- Efendi D, Litz R y Alorani F. 2001. Cryoconservation of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures *in vitro*. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 37:39 (Abstract).
- García L, Pérez J, Rodríguez M, Pérez B, Martínez Y y Sarría Z. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal* 4(2):101-105.
- Iriondo J y Pérez C. 2002. Micropropagation and *in vitro* storage of *Centarium rigualii* Esteve (Gentianaceae). *Israel Journal of Plan Sciences* 44(23):115-123.

- Montalvo-Peniche M, Iglesias-Andreu L, Mijangos-Cortez J, Nahuat-Dzib S, Barahona-Pérez F, Canto-Flick A y Santana-Buzzy N. 2007. *In vitro* germplasm conservation of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience* 42(5):1-6
- Reed P. 1988. Stock plant influences micropropagation success. *Acta Horticulturae* 226:41-52
- Suarez I. 2003. Introducción a la Biotecnología Agrícola. Universidad de Córdoba, *Grupo de Publicaciones Universidad de Córdoba*, Montería, p8-13.

CONCLUSIÓN GENERAL

El programa de investigación del Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe con énfasis en la caña flecha ha generado nuevos conocimientos sobre el manejo del cultivo de tejidos y la genética de esta especie por un período cercano a los 20 años, que se sintetizan en la presente publicación de la segunda edición de “Biotecnología Aplicada a la Caña Flecha”, el cual es el resultado de la contribución de entidades como el Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe (IBAC) de la Universidad de Córdoba, de investigadores asociados, estudiantes y personal de apoyo con cuyo arduo trabajo se lograron obtener los resultados de los trabajos científicos que aquí se consignan.

El programa de investigación en caña flecha planteó desde un inicio dos objetivos: conocer la diversidad genética de los diferentes cultivares de caña flecha que crecen en la región para contribuir a su conservación, y desarrollar un mecanismo eficiente de propagación para producir de forma sostenida grandes cantidades de material de siembra de forma sostenida y amigable con el medio ambiente. El empeño del personal científico y el apoyo de las entidades y dependencias asociadas, hicieron posible la realización de estudios de caracterización molecular de diferentes genotipos, y el desarrollo de mecanismos que permitieran la conservación de estos en condiciones *in vitro* por largos períodos de tiempo. De forma alterna, el desarrollo de aproximadamente 10 estudios en el componente de propagación *in vitro*, permitió generar un protocolo de micropropagación que

no solamente tiene una alta eficiencia en su tasa de multiplicación sino que permitió bajar los costos del material producido, reducir los tiempos de obtención de las plantas y mantener altos estándares de calidad genética y fenotípica, el cual ha sido evidenciado no solo en condiciones de laboratorio sino también en la eficiencia de la adaptación y crecimiento de las plantas micropropagadas en campo.

La segunda, y final, edición de Biotecnología Aplicada a la Caña Flecha provee a investigadores, productores y a todas las personas asociadas a la conservación, cultivo y aprovechamiento de la caña flecha con información relevante de alto rigor científico para la toma de decisiones en la elaboración de planes y proyectos relacionados con la producción y almacenamiento de material de siembra de los principales cultivares de caña flecha. Esperamos este trabajo contribuya con la preservación de las poblaciones naturales de la especie y favorezca el aprovechamiento comercial de la planta de una forma amigable con el medio ambiente.

**BIOTECNOLOGÍA APLICADA A
LA CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.)**

Segunda Edición



ISBN 978-958-5104-27-3