MICORRIZACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Sacharum officinarum*)[1]

Arbuscular mycorrhization in micropropagated sugar cane plants (*Sacharum officinarum*)

Elia M. Soria A.[2], Carlos Reyes E.[3], Zenaida Occeguera A.[3] y Carlos Pereira M.[2]

ABSTRACT

The experiment was carried out in the adaptation phase of micropropagated sugar cane (*Sacharum officinarum*) plants of the Provincial Sugar Cane Experimental Station, Villa Clara, Cuba. Micropropagated plants, variety C323-68, of three heights, were inoculated with the biofertilizer Arbuscular Mycorrhizal (MA) prepared by the Provincial Soil Laboratory of Villa Clara province, with a strain of *Glomus* sp. The biofertilizer was blended with the substratum in three doses: 47, 94 and 188 kg m^{-3}. The main morphological parameters evaluated were as follows: survival, height, number of leaves, dry and fresh weight of foliage and roots, as well as the presence of pests and diseases. On transplanting, the level of MA colonization in the roots of the micropropagated plants was determined. The results obtained indicate an improvement in the characteristics of the micropropagated plants when they are inoculated with MA in the intermediate phase, and a good colonization of the root is achieved, which guarantees the transfer of the microorganism (MA) to the field. The best results were obtained with 188 kg biofertilizer with 1 m^3 of substrate.

Key words: sugarcane, micropropagation, arbuscular mycorrhiza, *Sacharum officinarum.*

RESUMEN

El trabajo se efectuó en la fase de adaptación de las plantas micropropagadas de caña de azúcar (*Sacharum officinarum*) de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Villa Clara, Cuba. Se utilizaron plantas micropropagadas de caña, de la variedad C323-68, de tres alturas, las cuales fueron inoculadas con el biofertilizante Micorriza Arbuscular, preparado por el Laboratorio Provincial de Suelos de Villa Clara, Cuba, con una cepa de *Glomus* sp. El biofertilizante fue mezclado con el sustrato en tres dosis: 47; 94 y 188 kg m^{-3}. Se evaluaron los principales parámetros morfológicos de las plantas micropropagadas: supervivencia, altura, número de hojas, pesos seco y fresco del follaje y de la raíz, así como la incidencia de plagas y enfermedades. En el momento del trasplante se determinó el nivel de colonización de las micorrizas arbuculares (MA) en las raíces de las plantas micropropagadas. Los resultados obtenidos indican un mejoramiento en las características de las plantas micropropagadas cuando se inoculan con MA en la fase

[1]Recepción de originales: 11 de mayo de 2000 (reenviado).
Trabajo presentado en el XII Forum de Ciencia y Técnica de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Septiembre 1998. Villa Clara, Cuba.
[2]Universidad Central de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carretera de Camajuaní km 5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. E-mail: emsa@uclv.etecsa.cu
[3]Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Autopista Nacional km 247, Apartado 20, Ranchuelo, Villa Clara, Cuba. E-mail: epica@civc.inf.cu

intermedia, y se logra una buena colonización de la raíz, lo que garantiza el traslado del microorganismo hasta el campo. El mejor resultado se obtuvo con la mezcla de 188 kg del biofertilizante con 1 m^3 de sustrato.

Palabras clave: caña de azúcar, micropropagación, micorrizas arbusculares, *Saccharum officinarum*.

INTRODUCCIÓN

Desde el año 1980 se desarrollan en Cuba trabajos de biotecnología de la caña de azúcar (*Sacharum officinarum*); en la década del 90 se estableció el uso de la micropropagación a escala comercial, con la aplicación de cultivos de tejidos. Esta temática ha permitido la producción de plantas de calidad para su uso en los complejos agroindustriales y unidades básicas de la producción cañera.

La producción de plantas micropropagadas tiene una etapa *in vitro* y otra etapa intermedia entre ésta y el campo, denominada fase de aclimatación o "endurecimiento". En dicha fase las plantas micropropagadas desarrollan un sistema radicular importante; durante este proceso la planta va adaptando su estructura y fisiología, pasando de un individuo casi heterótrofo a uno totalmente autótrofo. Lo más importante en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radicular, lo cual le permitirá soportar el estrés a que son sometidas al ser plantadas en el campo.

El uso de fertilizantes químicos en esta fase se ha llevado a cabo con buenos resultados, no obstante, se pueden obtener resultados similares a la fertilización mineral con el uso de biofertilizantes, los cuales producen efectos positivos sobre las plantas y disminuyen los posibles peligros de contaminación ambiental. Entre los biofertilizantes que pueden tener efectos positivos en el desarrollo de la zona radicular de las plantas se encuentran las micorrizas arbusculares (MA), las cuales se consideran como hongos mejoradores de la calidad en plantas micropropagadas de diferentes cultivos. Mazziatelli y Shubert (1990) demostraron el efecto en plantas micropropagadas de *Vitis berlandes* x *rupestri*, Subhan *et al.* (1998) demostraron el efecto en plantas micropropagadas de *Sesbania sesban*, y Azconaguilar *et al.* (1997) lo señalaron en plantas micropropagadas de yuca (*Manihot sculenta*). En banano (*Musa* sp.) micropropagado se reportan los trabajos de Jaizme *et al.* (1997). En Cuba se han realizado varios estudios en diferentes cultivos y se han reportado también en caña de azúcar (Ortiz *et al.*, 1998).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la micorrización sobre la calidad de las plantas micropropagadas de caña de azúcar, determinar la mejor dosis de inóculo de MA para mezclar con el sustrato, y conocer la efectividad de colonización de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló de noviembre de 1997 a enero de 1998, en la fase de adaptación de plantas micropropagadas de caña de azúcar en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (EPICA) de Villa Clara, Cuba. Se estableció un experimento totalmente aleatorio.

Se utilizaron plántulas de la variedad C323-68 de tres tipos, las cuales se clasificaron de la siguiente forma: a) Plántulas tipo A: plantas bien desarrolladas, con altura mayor de 5 cm; b) Plántulas tipo B: plantas con tamaño entre 3 y 5 cm de altura; y c) Plántulas tipo C: plantas con poco desarrollo, menores de 3 cm de altura.

Estas plántulas fueron plantadas en bandejas de poliuretano de 247 orificios. Previamente el

sustrato se mezcló con 3 dosis del biofertilizante micorrizas arbusculares (MA), el cual fue producido y comercializado por el Laboratorio Provincial de Suelos de Villa Clara, perteneciente al Ministerio de Agricultura (MINAGRI). Las dosis utilizadas fueron: a) Testigo: sin inoculación; b) Dosis 1: 1 g/orificio; c) Dosis 2: 2 g/orificio; d) Dosis 3: 4 g/orificio. Se debe indicar que 1 g/orificio es equivalente a 47 kg de biofertilizante por m^3 de sustrato.

El sustrato utilizado contenía 80% de cachaza (residuo sólido del proceso de producción de azúcar) y 20% de zeolita (mineral procedente de los yacimientos naturales existentes en la provincia de Villa Clara, Cuba). La composición química se presenta en el Cuadro 1. El estado fitosanitario fue satisfactorio, no existiendo presencia de fitonemátodos ni hongos fitopatógenos.

El biofertilizante utilizado se preparó con una cepa *Glomus* sp., recomendada por el Instituto de Ecología y Sistemática del Centro de Investigaciones de Tecnología y Medio Ambiente de Cuba (CITMA).

Las plántulas se mantuvieron durante 45 días en la fase de adaptación, con riego localizado dos o tres veces al día, y control fitosanitario según las normas nacionales de producción de plantas micropropagadas (MINAZ, 1994).

Cuadro 1. Características químicas del sustrato
Table 1. Chemical characteristics of the substrate

Nutrientes	Porcentaje
Nitrógeno	2,72
Fósforo	2,64
Potasio	0,53
Calcio	4,24
Magnesio	0,26
Materia orgánica	61,79
Carbono	35,84
pH	6,8
Carbono/Nitrógeno	13,17

Se evaluó la supervivencia de las plántulas a los 15 días de plantadas. A los 45 días de la plantación se seleccionaron 30 plántulas por tratamiento y se evaluó: número de hojas, altura de la plántula, peso fresco y seco del follaje (hojas, tallos y pecíolos), peso fresco y seco de la raíz, e incidencia de plagas y enfermedades.

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente por el sistema SPSS/PC para Windows (SPSS, 1997), utilizando ANDEVA de clasificación simple para un solo factor, y prueba de comparación de medias por Duncan. El porcentaje de pérdidas se comparó por ANDEVA de proporciones sin repeticiones.

La colonización de la raíz por las MA se determinó por la técnica de azul de tripán de Phillips y Hayman (1970). Para ello se realizaron tinciones de la raíz con 4 tiempos de digestión con vista a determinar la posibilidad del uso de esta técnica en plantas micropropagadas de caña de azúcar. Se determinó la presencia de MA por observación de 30 campos del microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 2 se muestran los porcentajes de pérdidas alcanzados por las plantas micropropagadas tipo A y B a los 15 días de sembradas. Se observa la influencia positiva de la micorrización en el proceso de adaptación, manifestándose la tendencia a un mayor número de plantas vivas cuando éstas son biofertilizadas, superando al testigo con diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$). Las plantas tipo C presentaron un pobre desarrollo vegetativo y radicular, no siendo posible evaluar la pérdida.

Cuando las plantas micropropagadas pasan de la fase *in vitro* a la fase de adaptación sufren un gran estrés, el cual puede ser atenuado por la acción benéfica de las micorrizas. Estos microorganismos se han reportado como agentes bióticos que contrarrestan el estrés en diferentes especies de plantas (Barea y Requema, 1994; Pliego y Barceló, 1994).

Cuadro 2. Porcentaje de pérdidas de las plantas micropropagadas a los 15 días de sembradas
Table 2. Loss percentage of micropropagated plants at 15 days after sowing

Tipo de planta	Tratamientos	Porcentaje de pérdida
Vitroplantas tipo A	Testigo	12,9 a
	Dosis 1	16,8 b
	Dosis 2	24,8 b
	Dosis 3	8,9 a
Vitroplantas tipo B	Testigo	28,3 a
	Dosis 1	115,3 c
	Dosis 2	227,5 a
	Dosis 3	23,0 b

Medias con diferentes letras en la misma columna difieren a $P < 0.05$ según Duncan.

Los Cuadros 3, 4 y 5 muestran el efecto de la biofertilización en los tres tipos de plántulas estudiados. Como se puede observar en los resultados, la dosis 3 influyó positivamente en el desarrollo de las plantas micropropagadas, lográndose plantas de mayor altura, muy superiores estadísticamente al testigo y al resto de las dosis, coincidiendo con lo planteado por Ortiz *et al.* (1998), quienes obtuvieron aumento de la altura de las plantas de caña micropropagada en valores entre 18 y 21% cuando se inocularon con MA. De igual forma se produjo este efecto en los pesos fresco y seco de las raíces, no así en el número de hojas y pesos fresco y seco del follaje, aunque en estos últimos parámetros los valores numéricos fueron siempre superiores en la dosis 3.

Al analizar estos resultados se observa que la dosis 3 (Cuadro 4) se mantiene como el mejor tratamiento, existiendo diferencias estadísticas con el testigo y con el resto de las dosis en todos los parámetros evaluados, lo que confirma que en la medida que la planta está más deteriorada el efecto de este biofertilizante es mayor; se obtuvieron resultados semejantes para las plántulas tipo C (Cuadro 5).

En las plantas micropropagadas tipo C no fue posible evaluar el efecto de las dosis 2 y 3, porque en la etapa en que se desarrolló el experimento se produjo un período de intensas lluvias que afectó estos dos tratamientos por la salpicadura de las gotas de agua, lo que provocó que el sustrato fuera extraído de los orificios de las cajas, por lo que la comparación del efecto de la micorrización sólo es posible entre el testigo y la dosis 1. De acuerdo con esta situación, se observa marcadamente el efecto positivo del biofertilizante sobre los parámetros evaluados, repitiéndose la situación anteriormente señalada, de un mayor efecto cuando la planta está en estado deteriorado, lográndose de esta forma un fortaleci-

Cuadro 3. Efecto de la micorriza arbuscular en el crecimiento de las plantas micropropagadas tipo A
Table 3. Effect of arbuscular mycorrhizal on the growth of micropropagated type A plants

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	PFF (mg)	PSF (mg)	PFR (mg)	PSR (mg)
Testigo	20,33 d	4,40 a	385,4 a	152 a	382 b	67,7 b
Dosis 1	26,76 c	4,13 a	356,2 a	126 a	359 b	60,7 b
Dosis 2	33,81 b	4,23 a	418,0 a	141 a	317 b	50,7 b
Dosis 3	38,35 a	4,23 a	459,1 a	154 a	443 a	69,3 a
ES	0,81	0,065	0,03	0,062	0,01	0,036
DT	8,93	0,736	0,409	0,684	0,207	0,0399

Medias con diferentes letras en la misma columna difieren a $P < 0,05$ según Duncan.
PFF: peso fresco del follaje. PSF: peso seco del follaje. PFR: peso fresco de las raíces. PSR: peso seco de las raíces. ES: error estándar. DT: desviación típica.

Cuadro 4. Efecto de la micorriza arbuscular en plantas micropropagadas tipo B
Table 4. Effect of arbuscular mycorrhizal on type B micropropagated plants

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	PFF (mg)	PSF (mg)	PFR (mg)	PSR (mg)
Testigo	24,15 b	4,43 b	534,3 b	81,3 b	267,3 b	32,3 b
Dosis 1	24,15 b	4,23 b	628,0 b	96,0 b	240,7 b	37,7 b
Dosis 2	23,70 b	4,23 b	562,0 b	91,0 b	282,7 b	52,3 a
Dosis 3	30,98 a	4,70 a	773,7 a	119,0 a	349,0 a	50,3 a
ES	0,6770	0,619	0,0259	0,0047	0,0151	0,003
DT	7,08	0,6786	0,28	0,051	0,1649	0,04

Medias con diferentes letras en la misma columna difieren a $P < 0,05$ según Duncan.
PFF: peso fresco del follaje. PSF: peso seco del follaje. PFR: peso fresco de las raíces. PSR: peso seco de las raíces.
ES: error estándar. DT: desviación típica.

Cuadro 5. Efecto de micorriza arbuscular en plantas micropropagadas tipo C
Table 5. Effect of arbuscular mycorrhizal on type C micropropagated plants

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	PFF (mg)	PSF (mg)	PFR (mg)	PSR (mg)
Testigo	17,44 b	4,60 b	426,5	63,0 b	120,2	3,0 c
Dosis 1	22,53 a	4,93 a	452,7	96,0 a	141,7	6,7 b
Dosis 2	18,03 b	4,40 b	399,7	72,0 b	156,1	3,5 c
Dosis 3	17,16 b	4,73 b	335,0	48,7 c	150,2	9,7 a
ES	0,5548	0,0630	0,0196	0,008	0,0140	0,0051
DT	6,7	0,6901	0,2145	0,08	0,1538	0,0558

Medias con diferentes letras en la misma columna difieren a $P < 0,05$ según Duncan.
PFF: peso fresco del follaje. PSF: peso seco del follaje. PFR: peso fresco de las raíces. PSR: peso seco de las raíces.
ES: error estándar. DT: desviación típica.

miento de la misma con el proceso de micorrización.

En el Cuadro 6 se hace una comparación múltiple utilizando los datos de los tres tipos de plantas micropropagadas en conjunto. Mediante este cuadro se corrobora el efecto del biofertilizante en la dosis 3, el cual en forma integral provocó un mayor crecimiento de la plántula y en general una mayor calidad en sus caracteres morfológicos.

En los tres tipos de plantas micropropagadas, estos resultados están avalados por el efecto que ejercen las MA sobre el crecimiento de los cultivos; se ha comprobado este efecto en plantas micropropagadas (Azconaguilar *et al.*, 1997), y en plantas de caña *in vitro* se ha demostrado que producen aumento del tamaño de la planta, mejor desarrollo del follaje y del sistema radicular (Ortiz *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos, en cuanto a la metodología de aplicación del biofertilizante, son adaptables al trabajo práctico de producción en una fábrica de plantas de caña *in vitro*, pues el biofertilizante se aplica mezclado con el sustrato y no de forma dosificada, como se ha reportado en otros trabajos. Esta metodología facilita el uso del biofertilizante.

Cuadro 6. Comparación para todas las plantas micropropagadas
Table 6. Comparation for all micropropagated plants

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	PFF (mg)	PSF (mg)	PFR (mg)	PSR (mg)
Testigo	22,043 b	4,47 a	406,3	107,6	297	41,7
Dosis 1	24,48 b	4,25 b	318,9	98,9	271	43,0
Dosis 2	25,18 ab	4,46 a	371,9	98,2	273	42,0
Dosis 3	28,83 a	4,55 a	627,9	109,7	318	48,4
ES	0,4626	0,03	0,19	0,0041	0,010	0,025
DT	8,77	0,7211	0,364	0,0711	0,189	0,3644

Medias con diferentes letras en la misma columna difieren a $P < 0,05$ según Duncan.
PFF: peso fresco del follaje. PSF: peso seco del follaje. PFR: peso fresco de las raíces. PSR: peso seco de las raíces. ES: error estándar. DT: desviación típica.

Partiendo de esta modificación del método de inoculación, se realizó una valoración del establecimiento de las micorrizas en las raíces de las plantas micropropagadas, comprobándose que las mismas se establecieron con las diferentes dosis estudiadas (Cuadro 7). Este resultado nos permite asegurar que las MA pasan al campo cuando se produce el trasplante de las plántulas.

Se utilizó el método de determinación del establecimiento de las MA en las raíces recomendado por Phillips y Hayman (1970), estableciéndose modificaciones considerando las características de las raíces de las plantas micropropagadas. Como se observa en el Cuadro 7 se puede determinar la presencia de MA en las raíces aun cuando éstas se sometieron al proceso de digestión durante 15 min, comparado con 1 h planteado por el método original.

Desde el punto de vista fitosanitario no se observó influencia de la micorrización en la incidencia de plagas y enfermedades. No hubo presencia de plagas, y la enfermedad que incidió con altos grados de ataque en todas las variantes (Cuadro 8), fue la roya parda producida por el hongo *Helminthosporium stenospilum* Drechsler. Herrera *et al.* (1994) reportaron esta enfermedad como la de mayor incidencia para la caña de azúcar en la fase de adaptación.

Cuadro 7. Resultados de la evaluación de la colonización de las micorrizas arbusculares en las raíces (%)
Table 7. Results of the evaluation of the colonization of arbuscular mycorrhizal in the roots (%)

Dosis	Tiempo			
	15'	30'	45'	60'
Testigo	10	16,6	16	10
Dosis 1	73	80	60	90
Dosis 2	60	83	70	100
Dosis 3	100	80	86	100

Cuadro 8. Grado de ataque de *Helminthosporium stenospilum* (%)
Table 8. Percentage of infestation of *Helminthosporium stenospilum* (%)

Tratamientos	Vitroplantas		
	A	B	C
Testigo	56	64	53
Dosis 1	66	67	61
Dosis 2	68	70	52
Dosis 3	67	69	48

Desde el punto de vista económico los resultados obtenidos en el trabajo se pueden valorar cualitativa y cuantitativamente. Desde el punto de vista cualitativo se logran ventajas al obtener plántulas de mayor calidad por su mayor altura, con mayor sistema radicular y mejor cantidad de materia seca, así como la presencia del microorganismo en sus raíces lo que garantiza un establecimiento más efectivo en el campo. El análisis cuantitativo se puede enfocar a partir de los porcentajes de disminución de las pérdidas en los primeros 15 días de plantadas las plantas micropropagadas. En las plántulas A se logró disminuir el porcentaje de pérdidas de 12,9 a 8,9% en la dosis 3, estando por debajo de los porcentajes de pérdidas permisibles (10%). En el caso de las plántulas B se disminuyen las pérdidas de 28,3% en el testigo, a 23% en la dosis 3, aunque en este caso ambos valores están por encima del parámetro permisible.

CONCLUSIONES

El biofertilizante "Micorriza" preparado por el Laboratorio Provincial de Suelos de Villa Clara, Cuba, permitió el establecimiento de MA en plantas micropropagadas en caña de azúcar y produjo un efecto positivo en sus principales características morfológicas.

Es factible utilizar el biofertilizante mezclado con el sustrato a razón de 188 kg de biofertilizante/m^3 de sustrato.

LITERATURA CITADA

Azconaguilar, C., M. Carlos, T. Troncoso, and J. M. Barea. 1997. Beneficial effect of Arbuscular Mycorrhizal on aclimatization of micropropagated Cassava plantlets. Scientia Horticulturae 72:63-71.

Barea, J.M., y N. Requemq. 1994. Recuperación de especies degradadas en ambientes mediterráneos. Elección de especies, propagación y establecimiento de las plantas. Información Técnica Económica Agraria (ITEA) Vol. Extra 15:287-326. Zaragoza, España.

Herrera, L., R.P. Hernández, y H. Grillo. 1994. Problemas fitosanitarios del banano, papa, caña de azúcar y el ajo en la fase de adaptación de plantas micropropagadas. Centro Agrícola 2:92-95.

Jaizme, M.C., and J. Pinochet. 1997. Growth response of banana to three mycorrizal fungi in *Pratylenchus goodeyi* infested soil. Nematropica 27:69-76.

Jaizme, M.C., P. Tenoury, J. Pinochet, and M. Jaumot. 1997. Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. Plant Soil 196:27-35.

Mazziatelli, M., and A. Shubert. 1990. Effect of several VAM endophytes and artificial sustrate on vitropropagated *Vitis berlandisi* x *rupestri* 1103. Agric. Ecosyst. Environ. 29:279-283.

MINAZ. 1994. Instructivo técnico sobre la micropropagación de la caña de azúcar en Cuba. 20 p. Ministerio de la Industria Azucarera, La Habana, Cuba.

Ortiz, R., C.F. De la Fé, y D. Lara. 1998. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. III. Uso de biofertilizantes y manejo de las vitroplantas en la fase de adaptación. Cultivos Tropicales 19(3):49-53.

Phillips, J.M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158-161.

Pliego, F., y A. Barceló. 1994. Micropropagación de plantas: estado actual y perspectivas futuras. Información Técnica Económica Agraria (ITEA) Vol. Extra (15):73-82. Zaragoza, España.

SPSS. 1997. Statistical Package for Social Science. Release 8. 24 p. SPSS Inc., Florida, USA.

Subhan, S., P. Shamirla, and P. Saradni. 1998. *Glomus fasciculatum* alternates transplantation shock of micropropagated *Sesbania sesban*. Plant Cell Rep. 17:268-272.