

**Elaboración de un procedimiento de
desinfección y establecimiento *in vitro* de caña
de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de
yemas axilares**

Amaru Ernesto Martínez Vega

Zamorano - Honduras
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre, 2005

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Elaboración de un procedimiento de
desinfección y establecimiento *in vitro* de caña
de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de
yemas axilares**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado Por:

Amaru Ernesto Martínez Vega

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reserva los derechos de autor

Amaru Ernesto Martínez Vega

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2005

Elaboración de un procedimiento de desinfección y establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares

Presentado por:

Amaru Ernesto Martínez Vega

Aprobado:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora Principal

Abelino Pitty, Ph. D.
Director Interino, Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Isidro Matamoros, Ph. D.
Asesor

George Pilz, Ph. D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph. D.
Coordinador, Area Temática, Fitotecnia

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios Padre, Señor mío y redentor nuestro.

A María Santísima

A mis padres y a mis hermanos

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

A mi Papito Dios, por haberme regalado cada uno de los días de mi vida, por acompañarme en todo momento y por enseñarme a disfrutar del amor al prójimo y de todo lo que él nos ha regalado.

A nuestra Santísima Madre la siempre Virgen María, a San Francisco de Asís y a San Antonio de Padua, por ser los fieles protectores y guías de mi vida, por ser los ejemplos de entrega a Dios que me han mantenido aferrado a mi Fe y a mis principios como Cristiano.

A mis padres Ovidio y Ernestina, por el sacrificio de entregar sus vidas ejemplares a un trabajo sin descanso, para brindarme el amor, la confianza, el respeto y la educación necesaria para salir adelante después de cada caída, a pesar de las dificultades.

A mis hermanos Fabiola y Manuel, por ser quienes me han dado la fuerza e inspiración para alcanzar mis metas, por todo lo que hemos vivido juntos y por estar siempre a mi lado.

A mi familia en general, por todo el apoyo que me han brindado y por animarme a ir en busca de mi superación.

Al Colegio Diocesano San Luís Gonzaga y a todos sus profesores, por haber contribuido con mi educación durante once años de mi vida.

A los jóvenes del grupo católico PROMESAS por haber compartido en cada semana momentos de amor y amistad para superar cada una de las pruebas vividas en Zamorano.

A mi queridísima colonia Nicaragüense, por haberme enseñado a vivir como buen Zamorano y por ser parte de mi vida durante estos cuatro años inolvidables.

A la clase Némesis`05, porque demostramos ser la mejor de las clases, al soportar juntos todos los cambios y pruebas vividos durante estos difíciles cuatro años.

A Dinie de Rueda por ser una asesora ejemplar y por sabernos conducir hacia el camino del éxito con sus consejos y dedicación.

A María Bravo, Alejandra Lara, Zoila Sandoval, Ericka Ramos y Prisca Rivera por todo el apoyo y asistencia que me brindaron para la realización de la investigación.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A mis padres por ser la base fundamental en mi educación y ayudarme a llegar con éxito hasta donde estoy.

Al gobierno Nicaragüense por todo el apoyo financiero brindado para realizar mis estudios de Ingeniería Agronómica en Zamorano.

Al fondo de becas de Zamorano por el apoyo financiero brindado para realizar mis estudios de Ingeniería Agronómica en Zamorano.

RESUMEN

Martínez, A. 2005. Elaboración de un procedimiento de desinfección y establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares. Proyecto especial para el programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 39p.

El coeficiente de reproducción convencional a través de esquejes para caña de azúcar es bajo y por eso es útil la reproducción *in vitro* de este cultivo. La Compañía Azucarera Tres Valles (CATV) está en proceso de renovación de sus plantaciones de caña, con variedades más productivas y resistentes a sequías como la variedad CP 72-2086, por lo que surge el interés de crear un protocolo de reproducción *in vitro* para esta variedad. Las hojas situadas por encima del último punto de crecimiento visible en plantas de 6 - 8 meses son los explante más utilizado para la obtención de tejido callogénico. Se evaluó el efecto de la interacción del medio de Payan y Tarcón y del medio básico Murashige y Skoog (MS) suplementado con las auxinas 2,4-D y Dicamba, con dos tipos de explantes foliares: hojas jóvenes sin abrir y hojas jóvenes recién abiertas. Para yemas axilares se evaluó el efecto de dos concentraciones de la citocinina BAP (6-benzilaminopurina): 2 y 4 mg/L en combinación con 2 mg/L de la auxina 2,4-D suplementadas en el medio básico MS. Para yemas axilares no existió diferencia significativa entre las dos concentraciones de BAP utilizadas, pero se observó una mayor tendencia en la formación de tejido callogénico al utilizar una concentración de 2 mg/L. No se obtuvo respuesta en la formación de tejido callogénico en los medios utilizados para explantes de hojas jóvenes sin abrir y recién abiertas. Para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 se recomienda realizar una desinfección rigurosa del material vegetal y utilizar antioxidantes en el proceso de siembra. Así mismo, se recomienda realizar cambios de medio nutritivo y eliminar el tejido necrótico de los explantes por lo menos una vez por semana, para reducir los efectos de la oxidación en la absorción de nutrientes del medio y en la formación de tejido callogénico.

Palabras clave: Desinfección, esterilización superficial, láminas foliares, callogénesis, Dicamba.

INDICE DE CONTENIDO

	Portada	i
	Portadilla	ii
	Autenticación	iii
	Página de firmas.....	iv
	Dedicatoria	v
	Agradecimientos.....	vi
	Agradecimientos a patrocinadores.....	vii
	Resumen	viii
	Índice de contenido.....	ix
	Índice de cuadro.....	xii
	Índice de figuras.....	xiv
	Índice de anexos	xv
1.	INTRODUCCION	1
1.1	OBJETIVOS	2
2.	MATERIALES Y METODOS	3
2.1	UBICACION	3
2.2	MATERIAL VEGETAL.....	3
2.3	PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCION.....	3
2.3.1	Medio de Cultivo	4
2.3.2	Desinfección	5
2.3.3	Preparación previa del material vegetal durante los procedimientos de desinfección	5
2.3.4	Primer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086	6
2.3.5	Segundo procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086.....	6
2.3.6	Tercer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio, dos concentraciones de hipoclorito de calcio y dos	

	tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086.....	7
2.3.7	Cuarto procedimiento de desinfección: Evaluación de una concentración de hipoclorito de sodio, una concentración de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086	7
2.3.8	Quinto procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de calcio, dos tiempos de exposición y baño María en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086	8
2.3.9	Siembra	9
2.3.10	Variables analizadas en las pruebas preliminares de desinfección.....	9
2.4	PRUEBAS PRINCIPALES EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE CAÑA DE AZUCAR, VARIEDAD CP 72-2086	10
2.4.1	Primer experimento: Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares	10
2.4.2	Segundo experimento: Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de explantes foliares	10
2.4.3	Siembra	11
2.4.4	Desinfección	12
2.4.5	Variables analizadas.....	12
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	13
3.1	PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCION.....	13
3.1.1	Primer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086	13
3.1.2	Segundo procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086.....	14
3.1.3	Tercer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio, dos concentraciones de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086.....	15
3.1.4	Cuarto procedimiento de desinfección: Evaluación de una concentración de hipoclorito de sodio, una concentración de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086	16
3.1.5	Quinto procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de calcio, dos tiempos de exposición y baño María en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086	16

3.2	PRUEBAS PRINCIPALES EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE CAÑA DE AZÚCAR, VARIEDAD CP 72-2086	20
3.2.1	Primer experimento: Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares	20
3.2.2	Segundo experimento: Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de explantes foliares	25
4.	CONCLUSIONES.....	29
5.	RECOMENDACIONES.....	30
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	31
7.	ANEXOS.....	33

INDICE CUADROS

Cuadro		Pag.
1	Composición del medio de cultivo MS modificado utilizado en las pruebas preliminares de desinfección para el establecimiento <i>in vitro</i> de yemas axilares y explantes foliares de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005.....	4
2	Resumen de los procedimientos utilizados en la desinfección del material vegetativo para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras 2005.....	9
3	Composición de los medios de cultivos utilizados en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-208, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005	11
4	Categorización de las variables analizadas en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005.....	12
5	Efecto de cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio a dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005	14
6	Efecto de dos concentraciones de hipoclorito de calcio, dos concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005	15
7	Efecto de una concentración de hipoclorito de calcio, una concentración de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005.....	16
8	Efecto de dos concentración de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005.....	17

9	Esquema de los tratamientos en las cinco siembras de las pruebas preliminares de desinfección, Zamorano, Honduras, 2005.....	18
10	Porcentaje de los niveles de formación de tejido callogénico a la semana siete durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005.....	20
11	Porcentaje de los niveles de oxidación a la semana siete durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005.....	21
12	Porcentaje de los niveles de necrosis a las siete semanas de establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005.....	23
13	Porcentaje de los niveles de contaminación a las siete semanas de establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.....	24
14	Porcentaje de los niveles de oxidación de los medios nutritivos utilizados en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares.....	25
15	Porcentaje de los niveles de oxidación en hojas jóvenes sin abrir y recién abiertas en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.....	26
16	Porcentaje de los niveles de necrosis de los medios nutritivos utilizados en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.....	26
17	Porcentaje de los niveles de necrosis en hojas jóvenes sin abrir y recién abiertas en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.....	27
18	Porcentaje de los tipos de contaminación de los medios nutritivos en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.....	27
19	Porcentaje de los tipos de contaminación en hojas jóvenes sin abrir y recién abiertas en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.....	28

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Tendencia de la media aritmética de la variable formación de tejido callogénico durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005	21
2	Tendencia de la media aritmética de los niveles de oxidación a la semana siete durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.....	22
3	Tendencia de la media aritmética de los niveles de necrosis a las siete semanas de establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.	23
4	Porcentaje de contaminación causada por hongos y bacterias después de siete semanas en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005	24
5	Porcentaje de contaminación causada por hongos y bacterias después de cuatro semanas en el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.....	28

INDICE ANEXOS

Anexo	Pag.
1	Literatura revisada para establecer la primera etapa <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 73-1547, Zamorano, Honduras, 2005. 33
1- A	Autores 33
1- B	Tipos de explantes utilizados 33
1- C	Procedimiento de desinfección 34
1- D	Hormonas suplementadas 34
1- E	Formulaciones nutritivas..... 35
1- F	Suplementos en el medio de cultivo 35
1- G	Vía de regeneración 36
2	Siembra de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005..... 37
3	Siembra de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005. 38
4	Esquema del primer experimento: Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005..... 39
5	Esquema del segundo experimento: Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005..... 39

1. INTRODUCCION

La caña de azúcar presenta gran importancia mundial y genera muchas investigaciones para su mejoramiento. Los métodos convencionales de selección, son uno de los problemas más comunes en los programas de mejoramiento de caña de azúcar. El tiempo que se demora en producir un nuevo cultivar en un ciclo completo de selección, es de 10 a 15 años, con la posibilidad que el nuevo cultivar se degenera temprano una vez establecido en el campo. El cultivo de tejidos in vitro permite reducir el tiempo de los programas de mejoramiento, generando una mayor variabilidad y una mejor selección de características deseables (Zambrano et al. 1994) (Anexo 1).

El coeficiente de reproducción convencional a través de esquejes para caña de azúcar es bajo y por eso es útil la reproducción in vitro de este cultivo. Esta técnica se aplica en los bancos de germoplasma, en el intercambio de material genético, en la producción comercial de semillas y en el saneamiento de clones para eliminar el mosaico (*Ustilago* sp.) y la enfermedad del retoño achaparrado (Pérez 1993).

Las primeras investigaciones sobre propagación de caña de azúcar a partir de cultivo in vitro iniciaron en los años sesenta, logrando establecer muchos cultivos como variedades comerciales. Las hojas situadas por encima del último punto de crecimiento visible en plantas de 6 - 8 meses son los explante más utilizado para la obtención de tejido callogénico. Los explantes incubados en medio con 2,4-D, producen entre un 30 y un 50% de callo embriogénico y un porcentaje similar en regeneración de plántulas. La inducción de callo embriogénico y la regeneración de plantas en medio suplementado con Dicamba alcanzan hasta un 90%, esta regeneración ocurre en menor tiempo que el observado en la inducción con 2,4-D (Marcano et al. 2002).

El ciclo de producción in vitro de caña de azúcar se ha determinado en cuatro etapas, las que tienen una duración entre 11 a 16 semanas en total, dependiendo de la variedad de caña de azúcar y del protocolo que se utilice para su producción. Estas etapas son iniciación, multiplicación, aclimatación y preparación de almacigo (Chavarría et al. 1999). Un factor de gran importancia en la reproducción de caña de azúcar es el coeficiente de multiplicación que se alcanza con la micropropagación, pudiéndose obtener numerosas plantas a partir de un solo meristema, en cuestión de varios meses. Para caña de azúcar se plantea la posibilidad de obtener 10,000 plantas por año, a partir de un meristema. Estudios reportan que se pueden producir hasta 200,000 plantas en seis meses, pero potencialmente esa cantidad se puede duplicar para el mismo tiempo, siempre partiendo de un solo individuo (Nodarse et al 1992).

La contaminación causada por microorganismos endógenos es uno de los problemas más comunes en el cultivo de tejido in vitro, haciéndose necesario realizar un establecimiento

del cultivo de tejidos de manera aséptica. Uno de los desinfectantes más utilizados en diferentes concentraciones y diferentes tiempos es el hipoclorito de sodio por ser efectivo y muy accesible. No obstante, una desinfección exitosa dependerá del tipo de tejido, su procedencia y otros factores (Salazar y Surga 1986).

En el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales uno de los problemas principales en algunas especies es la oxidación fenólica. El uso de antioxidantes añadidos al medio de cultivo, como una forma de contribuir a disminuir la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en altas concentraciones en los tejidos de caña de azúcar, utilizados con mayor frecuencia en el cultivo *in vitro*; se previene así la producción de quinonas, compuestos inhibitorios del crecimiento en las células vegetales. La caña de azúcar es una de las especies que presenta problemas por oxidación fenólica al propagarse de forma *in vitro*, indicando que esta oxidación está ligada a tres caracteres: al genotipo, a la naturaleza del explante y a la naturaleza de la auxina usada en el medio de cultivo (Zambrano et al. 1994).

La oxidación es una respuesta de metabolismo al realizar una herida en los explantes, es una respuesta inmediata e implica la liberación en el medio de polifenoles presentes en los tejidos por la acción de las peroxidasas y las polifenoloxidasas, durante la desorganización celular ocasionada al momento de realizar una herida, ya que al cortar se exudan compuestos fenólicos de los tejidos que luego se oxidan ennegreciendo el medio y afectando el crecimiento y supervivencia de los mismos. Las quinonas y los productos marrones formados, son inhibidores del crecimiento y pueden jugar un rol importante en la resistencia de los tejidos a los microorganismos patógenos. La síntesis fenólica conduce a una lignificación de los tejidos para proteger contra la desecación y contra la invasión de organismos patógenos (Zambrano et al. 1994).

1.1 OBJETIVOS

Con base en lo anterior se decidió realizar una investigación que tuvo como objetivo general lograr el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares y explantes foliares y como objetivos específicos: determinar el mejor proceso de desinfección o esterilización superficial para cada tipo de explante que se va a evaluar en este estudio, evaluar el mejor tipo de explante, entre yemas axilares y tejido foliar, para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, evaluar el efecto de las auxinas 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y Dicamba (Ácido 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoico) en el establecimiento *in vitro* de explantes foliares, evaluar el efecto de la citocinina BAP (Benzylaminopurina), combinada con la auxina 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares, determinar los niveles de hormonas Dicamba, 2,4-D y BAP que generen mejores resultados para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 UBICACION

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación (LCTM) de Zamorano, Honduras durante los meses de mayo - octubre de 2005. Dentro del laboratorio se contó con todas condiciones y equipo adecuado para el desarrollo del experimento.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Para este estudio se utilizaron plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086 provenientes directamente de los campos de la Compañía Azucarera Tres Valles de Honduras (CATV). Estas plantas tenían una edad de ocho meses al momento de ser cortadas, con una altura promedio de 3.5 metros y un promedio de 11 yemas por plantas. Además de ser la más resistente y tolerante a las sequías, la variedad CP 72-2086 es una variedad de floración temprana y es la más productiva en rendimiento de azúcar procesada por hectárea en la CATV.

Para el experimento con yemas axilares se utilizaron yemas completamente formadas y sanas ausentes de cualquier daño mecánico causado por insectos o por mal manejo del cultivo. Las yemas fueron escindidas de los tallos en el laboratorio y con la ayuda de un estereoscopio.

En el experimento de explantes foliares se utilizó la hoja más joven aún sin abrir, así como la última hoja abierta y totalmente expandida. Estas hojas fueron escogidas ya que estas presentaban un mejor vigor de crecimiento y una menor contaminación por estar menos tiempo expuestas a condiciones ambientales no controladas. El material vegetal fue seleccionado y preparado en el LCTM de Zamorano.

2.3 PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCION

Para el desarrollo de la investigación se realizaron pruebas preliminares de desinfección en las que se utilizaron yemas axilares y explantes foliares sembrados en un medio básico modificado de Murashige y Skoog (MS) para un mejor desarrollo de los explantes. Estas modificaciones a la formulación básica MS fueron recomendadas en una investigación previa que se llevó a cabo con otra variedad de caña de azúcar (Peña 1998).

Los explantes foliares y las yemas axilares son los tejidos más utilizados para la propagación *in vitro* de caña de azúcar. Con estas pruebas de desinfección se determinó el mejor procedimiento en el que se obtuvo el menor porcentaje de contaminación tanto para yemas axilares como para explantes foliares.

2.3.1 Medio de Cultivo

Para la siembra de las yemas axilares y de explantes foliares en las pruebas preliminares de desinfección de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 se utilizó un medio basal MS modificado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo MS modificado utilizado en las pruebas preliminares de desinfección para el establecimiento *in vitro* de yemas axilares y explantes foliares de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005.

Componentes	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370
Micronutrientes	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄	0.25
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025
Fe Na EDTA	37.3
Componentes orgánicos	
Mioinositol	100
Tiamina	1.0
Cisteína	50
Ácido cítrico	100
Agua de coco	10 ml
Caseína hidrolizada	100
Sacarosa (g)	30
pH	5.7

Fuente: Peña 1997.

2.3.2 Desinfección

La contaminación, particularmente de tipo endógena, ocasionada por hongos y bacterias es uno de los principales problemas que afectan la técnica del cultivo *in vitro* de tejidos. Estos microorganismos al encontrarse en el interior del tejido (vasos conductores o espacios intercelulares), hacen sumamente difícil la esterilización del material vegetal. Los problemas ocasionados por la contaminación bacteriana en el desarrollo de ciertas especies vegetales sembradas *in vitro*, son la causa de numerosos fracasos.

El procedimiento de desinfección es muy importante en el establecimiento *in vitro* de cualquier cultivo, representa el cuello de botella para pasar a las siguientes etapas y si no se logra superar es muy difícil realizar investigaciones para la propagación *in vitro* de cultivos de importancia agrícola y económica.

Debido a que el material vegetal provenía directamente del campo, antes de realizar el experimento de establecimiento *in vitro* de la variedad CP 72-2086 de caña de azúcar a partir de yemas axilares y explantes foliares, se llevaron a cabo cinco pruebas de desinfección en fechas distintas para definir un procedimiento adecuado de desinfección para cada tipo de explante.

En cada procedimiento se modificaron los desinfectantes, sus concentraciones y los tiempos de exposición de los tejidos a los mismos, con el propósito de reducir el porcentaje de contaminación de la siembra anterior, lo que no permitía obtener los explantes necesarios para realizar los estudios planteados en la investigación.

2.3.3 Preparación previa del material vegetal durante los procedimientos de desinfección

Para realizar los cinco procedimientos de desinfección que se detallan a continuación, el material vegetal y los explantes fueron previamente preparados en un proceso de limpieza que se detalla a continuación:

- a) En el invernadero se lavaron las cañas con agua a presión antes de ser transportadas al laboratorio.
- b) Dentro del laboratorio las yemas axilares fueron escindidas de las cañas con la ayuda de un estereoscopio, dejándoles una pequeña base del tallo para evitar daños del meristema.
- c) Las láminas foliares fueron segmentadas a partir de las hojas más jóvenes en láminas de 6×4 cm aproximadamente.
- d) Ambos tipos de explantes fueron lavados en una solución con agua y detergente comercial.
- e) Ambos tipos de explantes en los tres primeros procedimientos de desinfección y los explantes de yemas axilares en el cuarto y quinto procedimiento de

desinfección, se sumergieron durante 30 min dentro de un beaker, con agitación constante y conteniendo una solución fungicida – bactericida de Benlate y Agrimisín, a una concentración de 2 g por litro de cada producto y 2 gotas de Tween 80 por cada 100 de solución.

- f) Seguidamente los explantes fueron expuestos a un enjuague con alcohol al 70% durante 20 segundos.
- g) A continuación se realizaron los tratamientos de desinfección correspondientes a cada procedimiento de desinfección.
- h) A nivel de la cámara de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril de 3 min cada uno, para remover los residuos de la solución desinfectante utilizada.
- i) Ambos tipos de explantes fueron expuestos, antes de la siembra, a una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico a razón de 150 y 100 mg/L respectivamente.

2.3.4 Primer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

La primera prueba de desinfección consistió en dos tratamientos, uno para cada tipo de explante, con tres repeticiones cada uno y diez tubos por cada repetición, para totalizar la siembra de 30 yemas axilares y 30 explantes foliares.

En el primer tratamiento las yemas axilares fueron expuestas a una concentración de 1% de hipoclorito de sodio y en el segundo tratamiento los explantes foliares se expusieron a una concentración de 5% de hipoclorito de sodio. El tiempo de exposición fue de 20 min para ambos tratamientos.

Para la preparación previa del material vegetal y los explantes en esta prueba, se siguió exactamente el proceso descrito en la sección 2.3.3.

2.3.5 Segundo procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

En esta siembra se realizaron en total ocho tratamientos, cuatro tratamientos para cada tipo de explante, con tres repeticiones cada uno y diez tubos por cada repetición, para totalizar 120 yemas axilares y 120 explantes foliares.

En esta segunda siembra se utilizaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio: 1 y 2% con dos tiempos de exposición: 20 y 25 min para yemas axilares y dos concentraciones de hipoclorito de sodio: 5 y 7.5% con dos tiempo de exposición: 20 y 25 min para láminas foliares.

En esta prueba se siguió exactamente la misma preparación previa del material vegetal y los explantes descrita en la sección 2.3.3., con la diferencia de que antes de transportar las cañas al laboratorio, a nivel de invernadero, las cañas enteras se mantuvieron durante 36 horas en una solución fungicida - bactericida de Benlate y Agrimisín a una concentración de 2 y 2.5 g/L respectivamente.

Al terminar el tiempo de exposición a la solución fungicida - bactericida se prosiguió con el mismo procedimiento, utilizando cada solución desinfectante de acuerdo a los tratamientos y tiempos de exposición correspondientes.

2.3.6 Tercer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio, dos concentraciones de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

La prueba de desinfección consistió en diez y seis tratamientos, ocho tratamientos para cada tipo de explante, con tres repeticiones cada uno y cinco tubos por cada repetición, para totalizar 120 yemas axilares y 120 explantes foliares.

Para cada tipo de explante se utilizó dos concentraciones de hipoclorito de sodio: 5 y 10% a dos tiempos de exposición: 20 y 25 min y dos concentraciones de hipoclorito de calcio: 2 y 4% con dos tiempo de exposición: 15 y 20 min.

Para la realización de estas pruebas se aumentó la cantidad de tratamientos y se tomaron nuevas medidas de contención en el campo y en los invernaderos. A diferencia de las dos pruebas anteriores, en esta tercera prueba, a nivel de campo, las plantas fueron asperjadas cuatro y dos días antes del momento del corte, con una solución fungicida - bactericida de Benlate y Agrimisín a una concentración de 2 y 2.5 g/L respectivamente.

Para el material vegetal y los explantes utilizados en este tercer procedimiento, se utilizó la misma preparación previa descrita en la sección 2.3.3., pero con una variante que consistió en cortar las cañas en trozos de 30 cm antes de sumergirlos durante 36 horas en la solución bactericida - fungicida de Benlate y Agrimisín a una concentración de 2 y 2.5 g/L respectivamente. Luego se continuó con la realización de los tratamientos correspondientes a la tercera prueba y finalmente los tres enjuagues de 3 min cada uno con agua destilada - estéril a nivel de la cámara de flujo laminar antes de proseguir con la siembra de ambos tipos de explantes.

2.3.7 Cuarto procedimiento de desinfección: Evaluación de una concentración de hipoclorito de sodio, una concentración de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

La cuarta siembra se efectuó solamente con yemas axilares y consistió en cuatro tratamientos, con tres repeticiones cada uno y cinco tubos por cada repetición, para totalizar 60 explantes de yemas axilares.

Para esta cuarta prueba de desinfección se utilizó una concentración de hipoclorito de calcio de 6% con dos tiempos de exposición: 15 y 20 min y una concentración de hipoclorito de sodio de 15% con dos tiempos de exposición: 20 y 25 min.

Para el material vegetal y los explantes utilizados en este cuarto procedimiento, se utilizó la misma preparación previa descrita en la sección 2.3.3., con las mismas adiciones que se hicieron para la tercera prueba: aplicaciones en campo, cortado de las cañas en trozos de 30 cm y sumersión de 36 horas de estos trozos en la solución bactericida - fungicida de Benlate y Agrimisín a una concentración de 2 y 2.5 g/L respectivamente. Luego se continuó con la realización de los tratamientos correspondientes. Al final se realizaron tres enjuagues de 3 min cada uno con agua destilada - estéril a nivel de la cámara de flujo laminar y se procedió con la siembra de los explantes.

2.3.8 Quinto procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de calcio, dos tiempos de exposición y baño María en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

Al igual que en la cuarta siembra, la quinta siembra se efectuó solamente con yemas axilares y consistió en cinco tratamientos, con tres repeticiones cada uno y cinco tubos por cada repetición, para totalizar 75 explantes de yemas axilares.

En esta quinta siembra se utilizaron dos concentraciones de hipoclorito de calcio: 6 y 8% con dos tiempos de exposición: 20 y 25 min.

Se realizó un quinto tratamiento en esta siembra que tuvo variaciones con respecto a los tratamientos realizados anteriormente y se explica a continuación:

Las yemas axilares una vez escindidas y lavadas con agua y detergente comercial se sumergieron en agua destilada - estéril para ser sometidas a un baño maría durante una hora a una temperatura constante de 50° C.

Después se sometieron a desinfección en hipoclorito de sodio al 10% durante una hora.

Para el material vegetal y los explantes utilizados en este quinto procedimiento, se utilizó la misma preparación previa descrita en la sección 2.3.3., con las mismas adiciones que se hicieron para la tercera prueba: aplicaciones en campo, cortado de las cañas en trozos de 30 cm y sumersión de 36 horas de estos trozos en la solución bactericida - fungicida de Benlate y Agrimisín a una concentración de 2 y 2.5 g/L respectivamente. Luego se continuó con la realización de los tratamientos correspondientes. Al final se realizaron tres enjuagues de 3 min cada uno con agua destilada - estéril a nivel de la cámara de flujo laminar y se procedió con la siembra de los explantes.

Un esquema general de todos los tratamientos previos a los procedimientos evaluados de desinfección se puede apreciar en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Resumen de los procedimientos utilizados en la desinfección del material vegetativo para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005.

	Invernadero				Laboratorio		
	Lavado con agua a presión	Aspersión de solución fungicida - bactericida en campo	Corte de las cañas en trozos de 30 cm	Sumersión de 36 horas en solución fungicida - bactericida en invernadero	Lavado en solución con agua y detergente comercial	Sumersión de 30 min en solución fungicida - bactericida	Alcohol al 70% por 20 segundos
Procedimiento 1	X				X	X	X
Procedimiento 2	X			X	X	X	X
Procedimiento 3	X	X	X	X	X	X	X
Procedimiento 4	X	X	X	X	X	X	X
Procedimiento 5	X	X	X	X	X	X	X

2.3.9 Siembra

En el caso de las yemas axilares, mientras permanecían en la solución antioxidante, se iban retirando las brácteas de cada yema con la ayuda de un estereoscopio. Una vez disectadas las brácteas, las yemas fueron puestas en tubos individuales que contenían el medio nutritivo semi – sólido correspondiente a cada tratamiento (Anexo 2).

En el caso de los explantes foliares, estos fueron también preparados mientras permanecían en la solución antioxidante, en láminas de 1 cm², eliminando los bordes. Cada lámina foliar fue sembrada individualmente de manera polar en un tubo que contenía el medio nutritivo semi – sólido correspondiente a cada tratamiento. Para los explantes foliares el medio fue solidificado con una inclinación de 45° para aumentar el área de contacto del explante (Anexo 3).

Todos los tratamientos fueron monitoreados durante dos semanas después de la siembra para evaluar el efecto de la desinfección sobre la incidencia de contaminación de los explantes.

2.3.10 Variables analizadas en las pruebas preliminares de desinfección

Determinar las variables a analizar ayuda a lograr satisfactoriamente los objetivos del estudio y facilitar la recolección de los datos y su interpretación a través de análisis

estadísticos. Las variables analizadas en las pruebas preliminares de desinfección incluyen: oxidación / necrosis y contaminación

2.4 PRUEBAS PRINCIPALES EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CAÑA DE AZUCAR, VARIEDAD CP 72-2086

2.4.1 Primer experimento: Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares

En la siembra de yemas axilares se utilizó el tratamiento con menor incidencia de contaminación del quinto procedimiento de desinfección evaluado. Este tratamiento consistió en un baño maría durante una hora a una temperatura constante de 50° C, seguido de una desinfección en hipoclorito de sodio al 10% durante una hora.

Este primer experimento de establecimiento estuvo formado por dos tratamientos en los que se combinó una concentración de 2 mg/L de la auxina 2,4-D con dos concentraciones de la citocinina BAP: 2 y 4 mg/L. Cada tratamiento estuvo conformado por tres repeticiones y 50 tubos por cada repetición, para totalizar 300 explantes de yemas axilares (150 para cada tratamiento) (Anexo 4). El medio de cultivo que se utilizó fue el mismo de las pruebas preliminares detallado en el Cuadro 1, con la variación que se sustituyeron los antioxidantes ácido cítrico y cisteína por el antioxidante Polivynyl Pirridoxine (PVP) a una concentración de 300 mg/L.

2.4.2 Segundo experimento: Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de explantes foliares

En la siembra de explantes foliares se utilizó el tratamiento con menor incidencia de contaminación del tercer procedimiento de desinfección evaluado. Este tratamiento consistió en una sumersión de los explantes en una concentración de 5% de hipoclorito de sodio durante 25 min.

La siembra de los explantes foliares consistió en tres tratamientos utilizando tres formulaciones nutritivas y dos tipos de explantes foliares: a) explantes foliares procedentes de hojas jóvenes aún sin abrir y b) explantes foliares procedentes de hojas jóvenes recién abiertas. Las hojas aún sin abrir eran las hojas que estaban en formación y cubiertas aún por las demás hojas.

Cada uno de los tres tratamientos estuvo conformado por tres repeticiones y treinta tubos por cada repetición, para un total de 270 explantes para cada tipo de hojas (Anexo 5). Las tres formulaciones nutritivas utilizadas en este experimento se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición de los medios de cultivos utilizados en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-208, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

	Medio suplementado con 2,4-D	Medio suplementado con Dicamba	Medio de Payan y Tarcón suplementado con 2,4-D
	mg/L completas	mg/L completas	mg /L completas
Sales MS			
Vitaminas			
Ácido nicotínico	0.5	0.5	-
Tiamina	1.0	1.0	1.0
Inositol	100	100	100
Piridoxina	0.5	0.5	-
Ácido cítrico	0.15	0.15	-
Aminoácidos			
Glicina	2	2	-
Arginina	50	50	-
Cisteína	50	50	-
Hormonas			
2,4D (auxina)	13 μM^1	-	13.6 μM^3
Dicamba (auxina)	-	30 μM^2	
Componentes Orgánicos			
Phytigel	2000	2000	2000
Sacarosa	20	20	20
Agua de coco	50 ml	50 ml	180 ml
pH	5.7	5.7	5.7

Fuente: Marcano, AK; Guevara, PM; Oropeza, M. y García, E. 2002

¹ equivalente a 3.0 mg/L

² equivalente a 6.6 mg/L

³ equivalente a 2.9 mg/L

2.4.3 Siembra

Para los dos experimentos de la etapa de establecimiento, las repeticiones número uno de cada tratamiento se sembraron el primer día. Las segundas y terceras repeticiones se sembraron el segundo y tercer día respectivamente.

Tanto las yemas axilares como los explantes foliares se sembraron siguiendo el mismo procedimiento de siembra de las pruebas preliminares (Sección 2.3.9.). Luego de la siembra de cada tipo de explante, estos fueron trasladados al cuarto de crecimiento donde permanecieron a una temperatura constante de 25° C y un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad durante 7 semanas.

2.4.4 Desinfección

Para esterilizar los instrumentos en cada siembra, las pinzas, bisturíes y platos petri que se utilizaron fueron autoclavados a una temperatura de 121° C, con una presión de 15 psi durante 20 min. El estereoscopio utilizado en la cámara de flujo laminar para la siembra fue desinfectado cuidadosamente con alcohol al 70%.

Después de obtener la desinfección adecuada para ambos tipos de explantes, estos fueron enjuagados tres veces con agua destilada - estéril a nivel de la cámara de flujo laminar para remover los residuos del desinfectante utilizado en la etapa anterior. Tanto las yemas axilares como los explantes foliares fueron puestos en una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico a razón de 150 y 100 mg/L, respectivamente dentro de un plato petri al momento de la siembra, para reducir los niveles de oxidación al momento de realizar el corte de los tejidos de los explantes.

2.4.5 Variables analizadas

La toma de datos se llevó a cabo durante las siete semanas que los explantes permanecieron en el cuarto de crecimiento. En todo este período los explantes fueron monitoreados semanalmente y se recopilaron datos de formación de tejido callogénico, oxidación, necrosis y contaminación de cada tubo. Para cada una de estas variables se estableció una categorización de los distintos niveles que se obtuvieron (Cuadro 4)

Cuadro 4. Categorización de las variables analizadas en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar variedad CP 72-2086, Zamorano, Honduras, 2005.

Categoría	Variable		
	Tejido callogénico cubriendo la superficie del explante	Oxidación	Necrosis
0	Sin callo	No oxidación	No necrosis
1	Inicios de formación de callo	Oxidación baja	Necrosis baja
2	> 10%, < 25%	Oxidación media	Necrosis media
3	> 25%, < 40%	Oxidación alta	Necrosis alta
4	> 40%	Oxidación severa	Necrosis severa

Se evaluó la presencia y/o ausencia de contaminación, así como la causa de la contaminación observada.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCION

Durante todas las pruebas preliminares se observó una mayor incidencia de contaminación en los explantes de yemas axilares que en los explantes foliares, esto se debe a que las yemas axilares están más cerca del suelo que las hojas, lo que las expone a humedades y temperaturas altas que generan el ambiente propicio para el desarrollo e incubación de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Los tratamientos para ambos tipos de explantes presentaron mayor contaminación causada por bacterias que por hongos, esto se debe a que las bacterias son más difíciles de eliminar de los explantes porque infectan los tejidos de manera interna y los hongos de manera más superficial. Las bacterias que causaron un mayor porcentaje de contaminación fueron del género *Xanthomonas sp.* y *Pseudomonas sp.* identificadas en el laboratorio de Microbiología de Zamorano. La contaminación causada por hongos que se dio en un menor porcentaje se debió principalmente a hongos del género *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* y *Paecellomyces sp.* que fueron identificados por el Dr. Phil Arneson, investigador y profesor asociado en el área de Fitopatología.

En la tercera siembra de desinfección se obtuvo el tratamiento más efectivo en reducir contaminación para los explantes foliares que fue el de 5% de hipoclorito de sodio por 25 min en agitación constante. Este tratamiento fue el que se utilizó en el experimento principal de explantes foliares al generar la cantidad suficiente de explantes libres de contaminación con los que se puede realizar el estudio.

Para los explantes de yemas axilares el mejor resultado de desinfección se obtuvo hasta la quinta siembra de desinfección utilizando el baño María a una temperatura constante de 50° C durante una hora seguido de la exposición de los explantes a 10% de hipoclorito de sodio durante una hora. Este resultado se debe a que la temperatura constante del baño María ayuda a desnaturalizar la mayoría de las proteínas y enzimas que forman parte de los microorganismos, reduciendo su incidencia y haciendo más eficiente el trabajo del producto desinfectante.

3.1.1 Primer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

En la primera prueba preliminar se dio una alta incidencia de contaminación causada por hongos y bacterias, debido a que el material vegetativo se obtuvo directamente del campo y el procedimiento de desinfección no fue muy rígido.

En las yemas axilares, al utilizar 1% de hipoclorito de sodio durante 20 min se presentó una contaminación del 100% al segundo día después de la siembra. De este total el 67% fue causado por bacterias y el 33% causado por hongos.

En los explantes foliares, al utilizar 5% de hipoclorito de sodio durante 20 min, se presentó una contaminación del 60% a los siete días después de la siembra. De este porcentaje el 75% fue causado por bacteria y el 25% por hongos.

3.1.2 Segundo procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

Una semana después de la siembra se observó, al igual que en la primera prueba, la misma tendencia de una mayor contaminación para las yemas axilares. Para ambos tipos de explantes y en todos los tratamientos, la incidencia mayor de contaminación fue causada por bacterias.

Para las yemas axilares se observó una menor contaminación (90%) al utilizar 2% de hipoclorito de sodio durante 25 min en agitación constante. Para los explantes foliares se observó una menor contaminación (20%) al utilizar 7.5% de hipoclorito de sodio durante 25 min en agitación constante. Los resultados observados en los tratamientos en esta siembra se detallan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Efecto de cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio a dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086. Zamorano, Honduras, 2005.

NaOCl %	Tiempo min	Yemas axilares			Explantes foliares		
		%			%		
		Cont. total	Cont. por bacteria	Cont. por hongo	Cont. total	Cont. por bacteria	Cont. por hongo
1	20	100	57	43			
1	25	97	55	45			
2	20	100	60	40			
2	25	90	56	44			
5	20				60	83	17
5	25				47	79	21
7.5	20				37	82	18
7.5	25				20	83	17

3.1.3 Tercer procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio, dos concentraciones de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

En la tercera siembra los menores porcentajes de contaminación (73%) en yemas axilares se observaron al utilizar 4% de hipoclorito de calcio durante 15 y 20 min en agitación constante.

Para los explantes foliares se observó una menor incidencia de contaminación al utilizar 2 y de 4% de hipoclorito de calcio durante 20 min en agitación constante (20 y 13% respectivamente), pero en estos tratamientos los explantes foliares no soportaron la concentración del producto y se perdieron por efecto de la toxicidad del tratamiento.

El tratamiento con menor contaminación y en el que los explantes no presentaron daño alguno y se mantuvieron sanos fue en el que se utilizó 5% de hipoclorito de sodio durante 25 min en agitación constante (27 y 33% respectivamente).

Los resultados de contaminación para cada tratamiento de la tercera siembra se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Efecto de dos concentraciones de hipoclorito de calcio, dos concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares y explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086. Zamorano, Honduras, 2005.

CaO ₂ Cl ₂ %	NaOCl	Tiempo min	Yemas axilares %			Explantes foliares %		
			Cont. total	Cont. por bacteria	Cont. por hongo	Cont. total	Cont. por bacteria	Cont. por hongo
2		15	80	67	33	87	69	31
2		20	80	67	33	20	67	33
4		15	73	73	27	47	71	29
4		20	73	55	45	13	100	0
	5	20	100	73	27	40	83	17
	5	25	100	67	33	27	50	50
	10	20	100	80	20	53	63	37
	10	25	87	77	23	33	60	40

3.1.4 Cuarto procedimiento de desinfección: Evaluación de una concentración de hipoclorito de sodio, una concentración de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

En la cuarta siembra de desinfección de yemas axilares se obtuvo la menor contaminación (20%) al utilizar 6% de hipoclorito de calcio durante 20 min en agitación constante. En el Cuadro 7 se presentan los resultados observados en esta siembra.

Cuadro 7. Efecto de una concentración de hipoclorito de calcio, una concentración de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086. Zamorano, Honduras, 2005.

CaO ₂ Cl ₂ %	NaOCl	Tiempo min	Yemas axilares %		
			Contaminación total	Cont. por bacteria	Cont. por hongo
6		15	47	71	29
6		20	20	67	33
	15	20	60	67	33
	15	25	87	62	38

3.1.5 Quinto procedimiento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de calcio, dos tiempos de exposición y baño María en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086

En esta quinta siembra de desinfección para yemas axilares, se obtuvo la menor contaminación (20%) al utilizar baño maría a una temperatura constante de 50° C durante 60 min. seguido de una exposición de los explantes a 10% de hipoclorito de sodio durante 60 min. La contaminación total de este tratamiento fue relativamente baja (20%) y de este porcentaje total, el 67% fue causado por bacterias y el 33% causado por hongos. En el Cuadro 8 se presentan los resultados observados en los cuatro tratamientos con hipoclorito de calcio de esta siembra.

Cuadro 8. Efecto de dos concentración de hipoclorito de calcio y dos tiempos de exposición en la desinfección de yemas axilares para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086. Zamorano, Honduras, 2005.

CaO ₂ Cl ₂ %	Tiempo min	Yemas axilares %		
		Cont. total	Cont. por bacteria	Cont. por hongo
6	20	67	80	20
6	25	33	80	20
8	20	47	71	29
8	25	27	75	25

En el Cuadro 9 se puede apreciar un resumen de los procedimientos de desinfección realizados en las pruebas preliminares. En este cuadro se especifica el tipo de desinfectante utilizado, las concentraciones de los mismos, los tiempos de exposición de los explantes a la solución desinfectante, el número de tratamientos por siembra y los resultados de contaminación observados en cada tratamiento.

Cuadro 9. Esquema de los tratamientos en las cinco siembras de las pruebas preliminares de desinfección, Zamorano, Honduras, 2005.

	Tratamiento	Yemas axilares		Explantes foliares		Tiempo min	Contaminación		
		%		%			Yemas axilares	Explantes foliares	
		Hipoclorito de sodio (NaOCl)	Hipoclorito de calcio (CaO ₂ Cl ₂)	Hipoclorito de sodio (NaOCl)	Hipoclorito de calcio (CaO ₂ Cl ₂)				
Primera siembra	1	1				20	100		
	2			5		20		60	
Segunda siembra	- Sumergimiento en solución fungicida - bactericida en invernadero	1	1			20	100		
		2	1			25	100		
		3	2			20	97		
		4	2			25	90		
		5			5		20		60
		6			5		25		37
		7			7.5		20		47
		8			7.5		25		20
Tercera siembra	- Aplicación de solución fungicida - bactericida en campo - Corte de las plantas en trozos de 30 cm - Sumergimiento en solución fungicida - bactericida en invernadero	1			2	15	80		
		2			2	20	73		
		3			4	15	80		
		4			4	20	73		
		5	5			20	100		
		6	5			25	100		
		7	10			20	100		
		8	10			25	87		

Cuadro 9. Esquema de los tratamientos en las cinco siembras de las pruebas preliminares de desinfección, Zamorano, Honduras, 2005.

	Tratamiento	Yemas axilares		Explantos foliares		Tiempo min	Contaminación	
		%		%			Yemas axilares	Explantos foliares
		Hipoclorito de sodio (NaOCl)	Hipoclorito de calcio (CaO ₂ Cl ₂)	Hipoclorito de sodio (NaOCl)	Hipoclorito de calcio (CaO ₂ Cl ₂)			
Tercera siembra	- Aplicación de solución fungicida - bactericida en campo	9			2	15		87
	- Corte de las plantas en trozos de 30 cm	10			2	20		47
	- Sumergimiento en solución fungicida - bactericida en invernadero	11			4	15		20
		12			4	20		13
		13		5		20		40
		14		5		25		53
Cuarta siembra	- Aplicación de solución fungicida - bactericida en campo	15			10	20		27
	- Corte de las plantas en trozos de 30 cm	16			10	25		33
		1		6		15		47
		2		6		20		20
		3	15			20		60
		4	15			25		87
Quinta siembra	- Sumergimiento en solución fungicida - bactericida en invernadero							
	- Aplicación de solución fungicida - bactericida en campo	1		6		20		67
	- Corte de las plantas en trozos de 30 cm	2		6		25		47
	- Sumergimiento en solución fungicida - bactericida en invernadero	3		8		20		33
		4		8		25		27
		5	Baño de María a 50° C/ una hora + 10% NaOCl/ una hora					

3.2 PRUEBAS PRINCIPALES EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CAÑA DE AZUCAR, VARIEDAD CP 72-2086

3.2.1 Primer experimento: Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares

En el experimento principal de yemas axilares y de explantes foliares se evaluó las variables: formación de tejido callogénico, nivel de necrosis, nivel de oxidación y tipo de contaminación. Estas evaluaciones se llevaron a cabo durante siete semanas en las que cada explante fue observado en forma individual.

3.2.1.1 Formación de tejido callogénico a partir de yemas axilares

En el análisis estadístico de esta variable se observó que no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos; Esto se determinó al utilizar la media aritmética de las tres replicas de cada tratamiento a la semana siete. De acuerdo al Cuadro 10, se puede apreciar que la incidencia de tejido callogénico en las categorías 2, 3 y 4 fue mínima en ambos tratamientos. Los porcentajes de cada nivel de formación de callo y la media aritmética para esta variable se muestran en Cuadro 10.

Cuadro 10. Porcentaje de los niveles de formación de tejido callogénico a la semana siete durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Hormonas mg/L		Niveles de formación de callo %					Media
	BAP	2,4-D	0	1	2	3	4	
1	2	2	24.71	52.80	17.91	3.63	0.95	1.06
2	4	2	24.56	52.37	21.21	1.86	0.00	0.96

0 = Sin callo

1 = Inicio de formación de callo

2 = Callo cubriendo > 10%, < 25% de la superficie del explante

3 = Callo cubriendo > 25%, < 40% de la superficie del explante

4 = Callo cubriendo > 40% de la superficie del explante

Los dos tratamientos presentaron el mismo comportamiento, un aumento en la formación de tejido callogénico en el transcurso del tiempo. Sin embargo, después de siete semanas de sembrado los explantes se observó mayor formación de tejido callogénico al utilizar 2 mg/L de BAP y 2 mg/L de 2,4-D (Figura 1). Este incremento se debe a que cada semana se formaba nuevo tejido callogénico y el que ya estaba formado pasaba paulatinamente a la categoría superior, generando un incremento en la media aritmética de cada tratamiento.

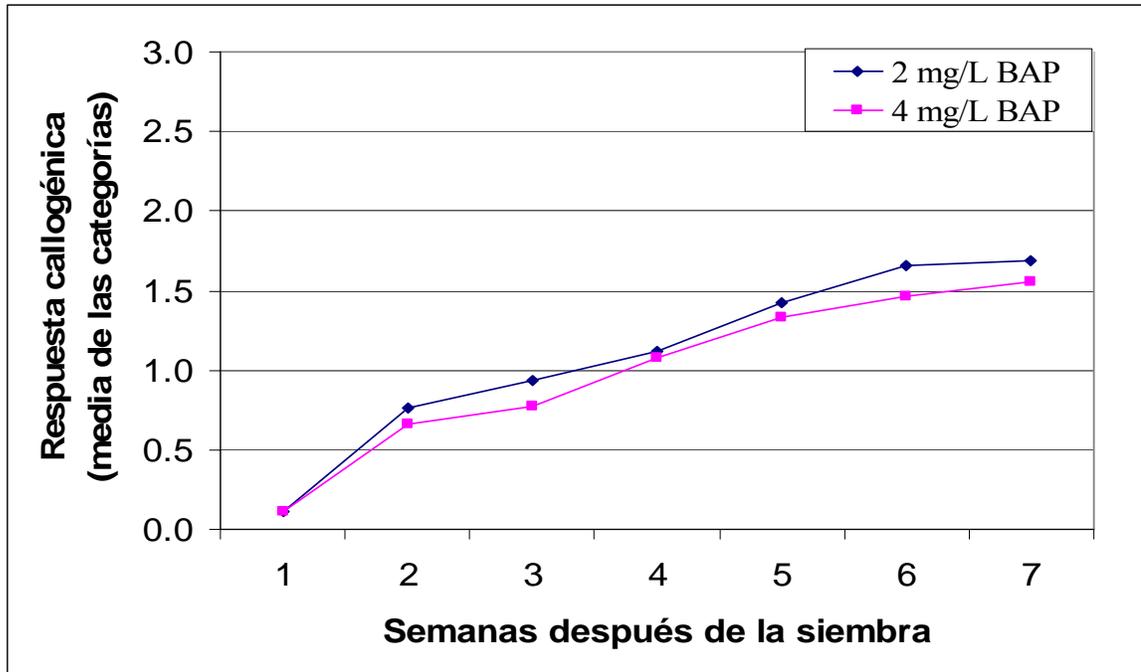


Figura 1. Tendencia de la media aritmética de la variable formación de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005.

3.2.1.2 Oxidación

Para analizar estadísticamente esta variable se utilizó la media que se obtuvo de las tres replicas de cada tratamiento a la semana siete. Se observó que esta variable no presenta diferencia significativa entre los dos tratamientos. Los porcentajes de cada nivel de oxidación y la media para esta variable obtenidos en ambos tratamientos se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Porcentaje de los niveles de oxidación a la semana siete durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Hormonas mg/L		Niveles de oxidación %					Media
	BAP	2,4-D	0	1	2	3	4	
1	2	2	18	38	32	11	1	1.36
2	4	2	15	42	31	11	1	1.38

0 = No oxidación; 1 = Oxidación leve; 2 = Oxidación media; 3 = Oxidación alta; 4 = Oxidación severa

Para ambos tratamientos se presentó una tendencia de aumento del nivel de oxidación, observándose un incremento a medida que pasa el tiempo. Al final del estudio de establecimiento *in vitro* (7 semanas) se observó una mayor oxidación al utilizar 2 mg/L de BAP.

Esta tendencia presentó reducción en las semanas cuatro y seis (Figura 2), debido a que el medio nutritivo fue renovado en las semanas tres y cinco.

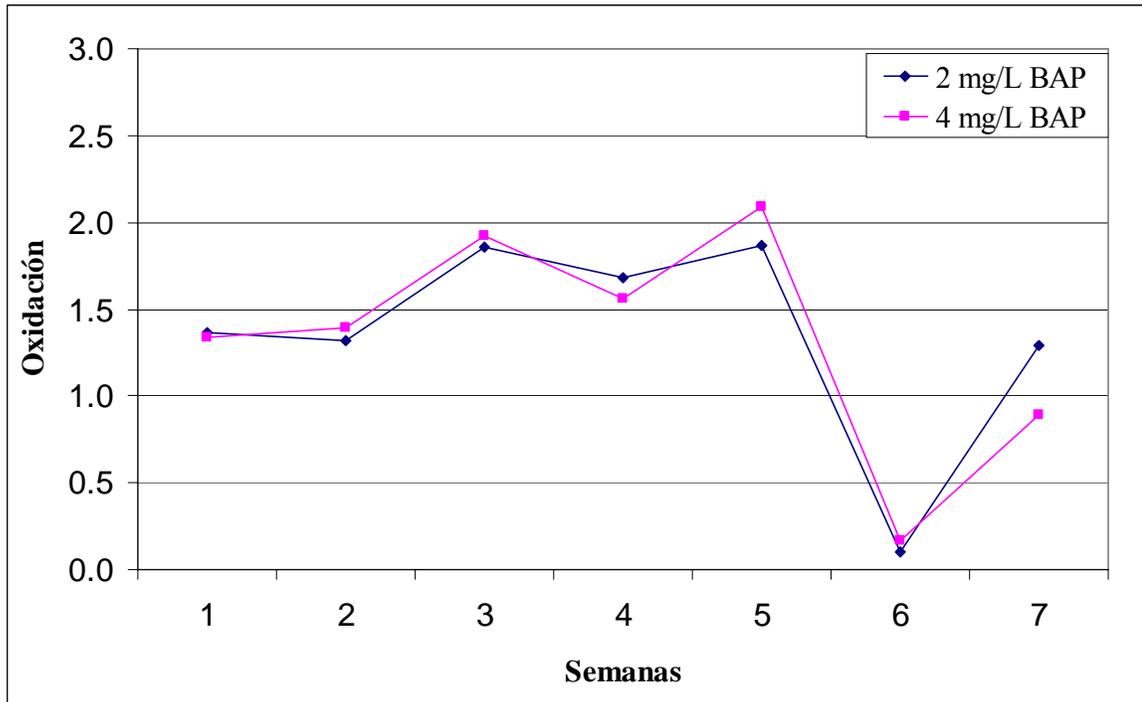


Figura 2. Tendencia de la media aritmética de los niveles de oxidación a la semana siete durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.

3.2.1.3 Necrosis

En el análisis estadístico de esta variable se utilizó la media aritmética de las tres replicas de cada tratamiento a la semana siete y no se encontró diferencia significativa para esta variable. Los resultados de este análisis se muestran en el Cuadro 12 en forma de porcentaje para cada nivel de necrosis y la media aritmética de cada tratamiento.

Cuadro 12. Porcentaje de los niveles de necrosis a las siete semanas de establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Hormonas mg/L		Niveles de necrosis %					Media
	BAP	2,4-D	0	1	2	3	4	
1	2	2	1	81	16	1	1	1.19
2	4	2	2	76	18	4	0	1.23

0 = No necrosis; 1 = Necrosis leve; 2 = Necrosis media; 3 = Necrosis alta; 4 = Necrosis severa

Se presentó una tendencia de disminución de los niveles de necrosis para los dos tratamientos, observándose un incremento a medida que pasa el tiempo. Al final del estudio de establecimiento *in vitro* (7 semanas) se observó una mayor incidencia de necrosis al utilizar 2 mg/L de BAP (Figura 3).

Se observa una disminución de la incidencia de necrosis en las semanas cuatro y seis, porque cuando se realizó el cambio de medio en las semanas tres y cinco se retiró el tejido necrótico de cada explante hasta donde fue posible, para que los explantes no tuvieran problemas con la absorción de los nutrientes del medio.

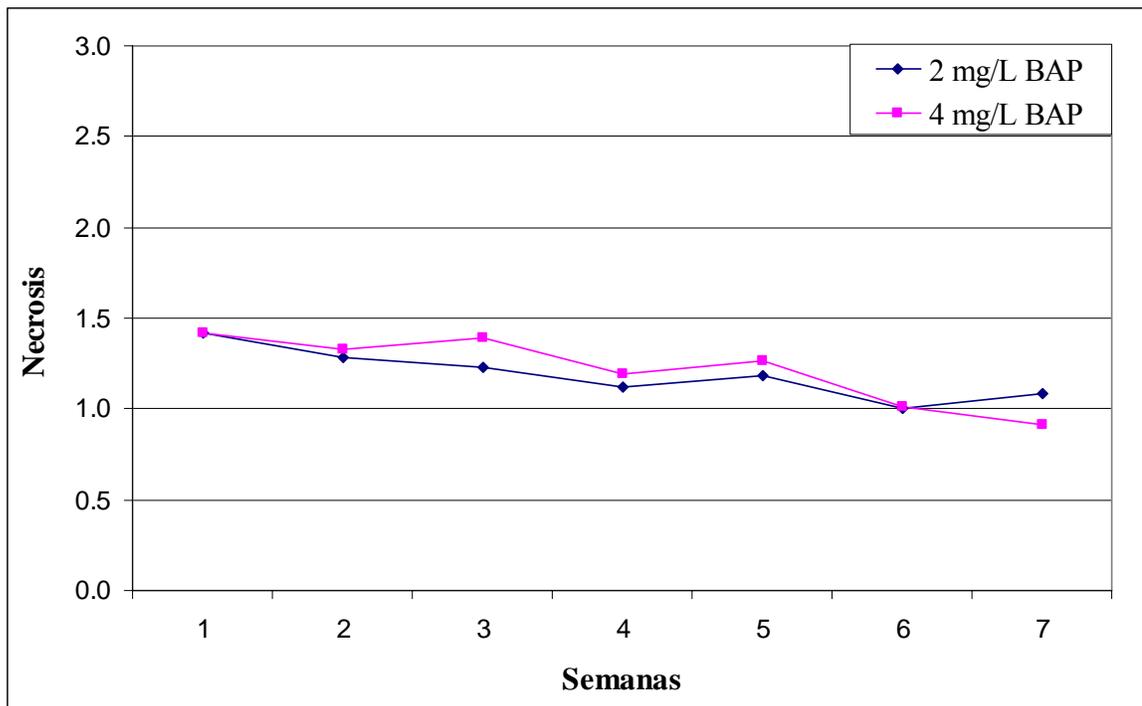


Figura 3. Tendencia de la media aritmética de los niveles de necrosis a las siete semanas de establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.

3.2.1.4 Contaminación

Se presentó 56 y 61% de contaminación en los tratamientos en que se utilizó 4 y 2 mg / L de BAP respectivamente. La contaminación por bacterias fue la que tuvo una mayor incidencia en ambos tratamientos. En el Cuadro 13 podemos observar los porcentajes de contaminación para cada categoría evaluada.

Cuadro 13. Porcentaje de los niveles de contaminación a las siete semanas de establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Hormonas mg/L		Contaminación %				Media
	BAP	2,4-D	Hongos	Bacterias	Hong. / Bact.	Total	
1	2	2	15	43	3	61	1.31 ^a
2	4	2	22	33	1	56	1.21 ^b

En ambos tratamientos se observó contaminación por bacteria, hongos y por ambos microorganismo a la vez y los datos para ambos tratamientos se muestran en la Figura 4.

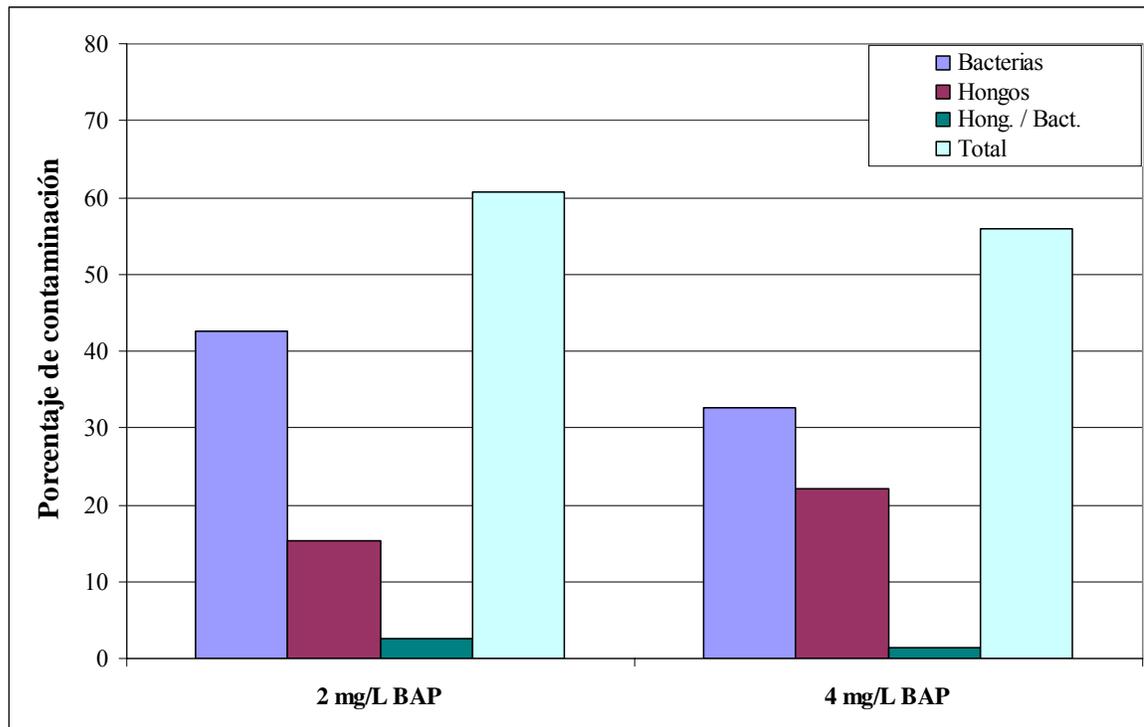


Figura 4. Porcentaje de contaminación causada por hongos y bacterias después de siete semanas en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.

3.2.2 Segundo experimento: Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de explantes foliares

Después de cuatro semanas de recopilación de datos en este experimento, no se observó ninguna formación de tejido callogénico, ni formación de brotes en ninguna de las formulaciones nutritivas utilizadas. No se observó una respuesta de regeneración en las hojas jóvenes sin abrir, ni en las hojas jóvenes recién abiertas, por esta razón no se realizó ningún análisis estadístico para encontrar diferencias entre los tratamientos, solamente se realizó un análisis de R^2 para determinar la frecuencia y los porcentajes de las variables: nivel de oxidación, nivel de necrosis y tipo de contaminación.

3.2.2.1 Oxidación

El medio de Payan y Tarcon y el medio MS suplementado con Dicamba presentaron una frecuencia de 34% de oxidación, frecuencia mayor en comparación con el medio suplementados con 2,4-D, en el que se observó una frecuencia de 32%. El medio de Payan y Tarcon presentó mayor porcentaje de incidencia del nivel de oxidación severa. El Cuadro 14 presenta los porcentajes de cada nivel de oxidación para los medios utilizados en el experimento.

Cuadro 14. Porcentaje de los niveles de oxidación de los medios nutritivos utilizados en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

Medio	Niveles de oxidación					Frecuencia
	%					%
	0	1	2	3	4	
Suplementado con 2,4-D	0	49	36	15	0	32
Suplementado con Dicamba	0	39	40	20	1	34
Payan y Tarcon	0	46	33	17	4	34

0 = No oxidación; 1 = Oxidación leve; 2 = Oxidación media; 3 = Oxidación alta; 4 = Oxidación severa

En los explantes de hojas jóvenes sin abrir se observó una frecuencia de oxidación de 65% y en los explantes de hojas jóvenes la frecuencia fue de 35%. Los explantes de hojas jóvenes sin abrir alcanzaron un 3% en el nivel de oxidación severa (nivel 5), a diferencia de los explantes de hojas jóvenes recién abiertas que no presentaron oxidación severa. Los porcentajes de cada nivel de oxidación para cada tipo de hoja se muestran en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Porcentaje de los niveles de oxidación en hojas jóvenes sin abrir y recién abiertas en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

Tipo de hoja	Niveles de oxidación					Frecuencia
	%					%
	0	1	2	3	4	
Abiertas	0	61	34	5	0	35
Sin abrir	0	36	37	24	3	65

0 = No oxidación; 1 = Oxidación leve; 2 = Oxidación media; 3 = Oxidación alta; 4 = Oxidación severa

3.2.2.2 Necrosis

El medio de Payan y Tarcon y el medio MS suplementado con Dicamba presentaron 34% frecuencia de necrosis. En el medio suplementado con 2,4-D se observó una frecuencia de necrosis de 32%. El medio de Payan y Tarcon y el medio suplementado con 2,4-D presentaron el mismo porcentaje de incidencia en todos los niveles de necrosis. Los porcentajes de necrosis observados para cada medio utilizado en el experimento se pueden corroborar en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Porcentaje de los niveles de necrosis de los medios nutritivos utilizados en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

Medio	Niveles de necrosis				Frecuencia
	%				%
	0	1	2	3	
Suplementado con 2,4-D	0	79	20	1	32
Suplementado con Dicamba	0	76	23	1	34
Payan y Tarcon	0	79	20	1	34

0 = No necrosis; 1 = Necrosis leve; 2 = Necrosis media; 3 = Necrosis alta

Los explantes de hojas jóvenes sin abrir presentaron una frecuencia del 65% de necrosis y en los explantes de hojas jóvenes recién abiertas se observó una frecuencia de necrosis de 35% (Cuadro 17). Se observó que el nivel de necrosis con mayor porcentaje de incidencia en los dos tipos de explantes fue el nivel de necrosis baja. Los dos tipos de hojas presentaron una baja incidencia (1%) en el nivel de necrosis alta (nivel 3).

Cuadro 17. Porcentaje de los niveles de necrosis en hojas jóvenes sin abrir y recién abiertas en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

Tipo de hoja	Niveles de necrosis				Frecuencia
	0	1	2	3	%
Abiertas	0	80	19	1	35
Sin abrir	0	77	22	1	65

0 = No necrosis; 1 = Necrosis leve; 2 = Necrosis media; 3 = Necrosis alta

3.2.2.3 Contaminación

En el medio suplementado con 2,4-D se observó una frecuencia de contaminación de 74%, mayor que en los medios suplementados con Dicamba y el medio de Payan y Tarcon, que presentaron frecuencias de 72 y 60%, respectivamente. El mayor porcentaje de contaminación en los tres medios fue causado por hongos. Los resultados para la variable contaminación en el segundo experimento los podemos observar en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Porcentaje de los tipos de contaminación de los medios nutritivos en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.

Medio	Contaminación				Frecuencia
	Hongos	Bacterias	Hong. / Bact.	Total	%
Suplementado con 2,4-D	7	6	0	13	74
Suplementado con Dicamba	6	5	0	11	72
Payan y Tarcon	4	6	1	11	60

Los explantes de hojas jóvenes sin abrir presentaron una frecuencia de contaminación de 4%, mucho menor que los explantes de hojas jóvenes recién abiertas que presentaron 24% (Cuadro 19), esto se debió a que las primeras nunca estuvieron expuestas a factores bióticos y abióticos que las infectaran en mayor medida. Las hojas jóvenes aún sin abrir tuvieron una mayor incidencia de contaminación por bacterias que por hongos, lo que demuestra que el material vegetal de esta variedad de caña presenta una fuerte infección endógena desde campo causada por estos microorganismos.

Cuadro 19. Porcentaje de los tipos de contaminación en hojas jóvenes sin abrir y recién abiertas en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

Tipo de hoja	Tipo de contaminación				Frecuencia
	%				%
	Hongos	Bacterias	Hong. / Bact.	Total	
Abiertas	14	9	1	24	41
Sin abrir	1	3	0	4	59

En los tratamientos suplementados con Dicamba y 2,4-D de los explantes de hojas jóvenes recién abiertas se observó un mayor porcentaje de contaminación causada por hongos que por bacterias, no así para el tratamiento de Payan y Tarcon (Figura 5), donde la contaminación por hongos fue menor.

Contaminación simultánea causada por ambos patógenos, hongos y bacterias, se observó en los tratamientos de hojas jóvenes recién abiertas pero en porcentajes bajos.

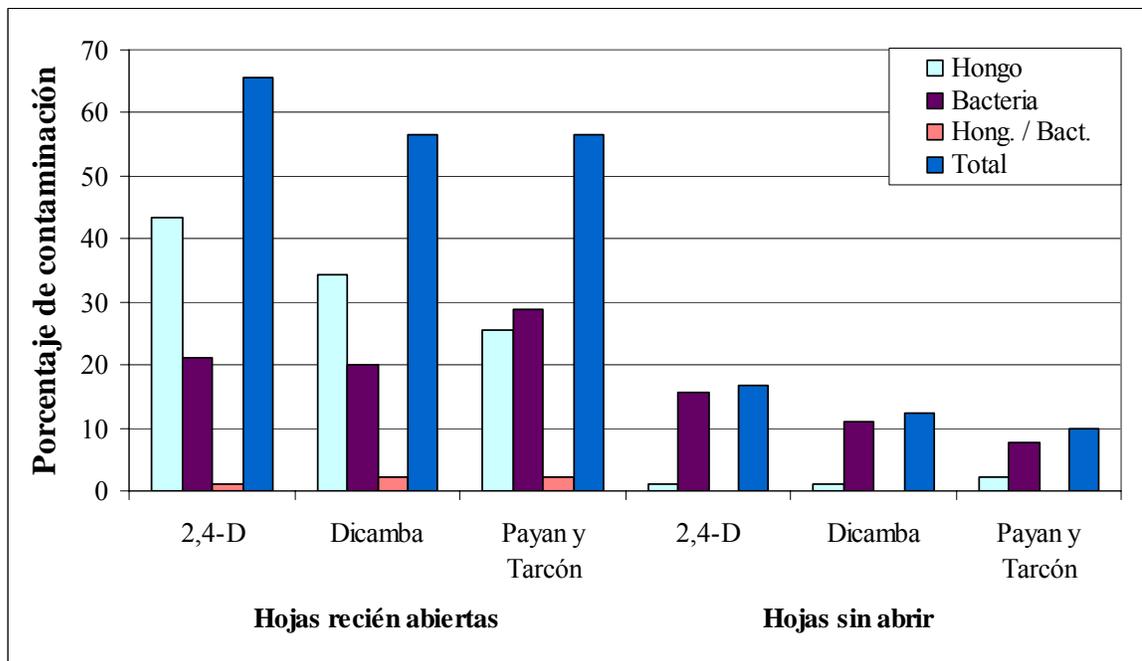


Figura 5. Porcentaje de contaminación causada por hongos y bacterias después de cuatro semanas en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

4. CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares.

La mejor desinfección de los explantes foliares se obtuvo al utilizar 5% de hipoclorito de sodio durante 25 min en agitación constante.

La mejor desinfección de los explantes de yemas axilares se obtuvo al utilizar un baño maría a 50° C de temperatura constante durante una hora, seguido de una desinfección en 10% de hipoclorito de sodio durante una hora en agitación constante.

Durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de yemas axilares, se observó formación de tejido callogénico.

Durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086, a partir de explantes foliares, no se observó algún tipo de regeneración bajo las condiciones de siembra del experimento.

Bajo las condiciones de siembra del experimento no se pudo establecer el efecto de las auxinas 2,4-D y Dicamba en el establecimiento *in vitro* de explantes foliares.

La citocinina BAP combinada con la auxina 2,4-D generan una respuesta de formación de tejido callogénico en los explantes de yemas axilares

Existe una mayor tendencia en formación de tejido callogénico al utilizar 2 mg/L de la citocinina BAP combinada con 2 mg/L de la auxina 2,4-D en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares.

5. RECOMENDACIONES

Se debe realizar una preparación previa del material vegetal para lograr un buen proceso de desinfección de los explantes de caña de azúcar variedad, CP 72-2086.

Evaluar otros niveles de la citocinina BAP y la auxina 2,4-D en el establecimiento *in vitro* a partir de yemas axilares.

Realizar transferencias a medio fresco y eliminar tejidos necrotizados en los explantes de yemas axilares una vez cada semana.

Al utilizar explantes foliares, evaluar la inducción bajo condiciones de obscuridad durante las dos primeras semanas después de la siembra; luego utilizar las mismas condiciones fotoperiódicas utilizadas en este experimento.

Al utilizar explantes foliares bajo las condiciones de la recomendación anterior, evaluar la siembra polar y apolar de los explantes.

Evaluar la siembra apolar de explantes foliares bajo las mismas condiciones del segundo experimento.

6. BIBLIOGRAFÍA

Chavarría, E.; Jiménez, B.; Yeh, F. 1999. Protocolo para la reproducción masiva *in vitro* de caña de azúcar en Costa Rica. (en línea). Costa Rica. DIECA – LAICA. Consultado 19 nov. 2004. Disponible en http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_XI/a50-6907-II_207.pdf

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Edit. por W Roca; L Mroginski. Cali, CO. Editorial XYZ. 970 p.

George, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture: Table of published result. 2 ed. Great Britain. Butter & Tanner Ltd. v. 2, 1333 p.

Marcano, A.K.; Molina, P.; Oropeza, M.; García, E. 2002. Optimización del proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar. (en línea). Caracas, Instituto de biología experimental. Consultado 3 oct. 2004. Disponible en http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf

Nodarse, O.; Santana, I.; China, A.; Carbó, L.; Díaz, A.; Hernández, C. 1992. Obtención y selección de sub-clones de caña de azúcar resistentes a la roya a partir de la variedad C127-78 mediante cultivo de tejidos. (en línea). La Habana. INICA-MINAZ. Consultado 20 oct. 2004. Disponible en <http://www.ceniap.fonaiap.gov.ve/bdigital/cana/cana1002/texto/obtencion.htm>

Peña Paniagua, M.R. 1997. Propagación *In Vitro* de la caña de azúcar: Micropropagación. Tesis Lic. Ing. Agr. Honduras. Zamorano. 36 p.

Pérez, J. 1993. Cultivo de tejido en la caña de azúcar: Micropropagación *In Vitro*. (en línea). Cali. CIAT. Consultado 20 oct. 2004. Disponible en http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo25_parte1.pdf

Salazar, E.; Surga, J.G. 1986. Aplicación de la técnica de cultivo de tejido meristemático *in vitro* a cuatro cultivares de caña de azúcar (*Saccharum spp*). (en línea). Maracay. CENIAP. Consultado 10 oct. 2004. Disponible en <http://www.ceniap.fonaiap.gov.ve/bdigital/cana/cana0401/texto/aplicacion.htm>

Salazar, E.; Surga, J.G. 1988. Métodos de desinfección de explantes de caña de azúcar en el cultivo *in vitro*. (en línea). Maracay. CENIAP. Consultado 18 oct. 2004. Disponible en <http://www.ceniap.fonaiap.gov.ve/bdigital/cana/cana0602/texto/metodos.htm>

Santana, I.; Nodarse, O.; Arencibia, A.; Rodríguez, A.J. 1996. Utilización del α -bromonaftaleno en la inducción de mutaciones en cultivo de tejidos de caña de. (en línea). La Habana. INICA. Consultado 23 oct. 2004. Disponible en <http://www.ceniap.fonaiap.gov.ve/bdigital/cana/cana1401/texto/utilizacion.htm>

Santana, I.; Nodarse, O.; Fernández, Z. 1992. Estudio comparativo de la propagación *in vitro* y por estacas en cuatro variedades de caña de azúcar. (en línea). La Habana. INICA. Consultado 19 nov. 2004. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/cana/cana1002/texto/estudio.htm>

Zambrano, A.; González, V.; Demey, J.R. 1994. Tiempo óptimo para el cambio de medio en suspensiones celulares de cuatro cultivares de caña de azúcar *Saccharum* spp: B6749, CP5659, V58-4 y V64-10. (en línea). Maracay. CENIAP. Consultado 23 oct. 2004. Disponible en http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v44_2/v442a020.html

Zambrano, A.; González, V.; Demey, J.R. 1995. Grupos homogéneos de crecimiento y manipulación *in vitro* de seis cultivares comerciales de caña de azúcar en Venezuela. (en línea). Maracay. CIAGRO-UNEFM. Consultado 13 mar. 2005. Disponible en http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v45_1/v451a040.html

7. ANEXOS

Anexo 1. Literatura revisada para establecer la primera etapa *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 73-1547, Zamorano, Honduras, 2005.

Anexo 1 – A Autores

1	O. Nodarse, I. Santana, A. China, L. Carbó, A. Díaz, C. Hernández
2	Ana Marcano, Pedro Molina, Maira Oropeza y Eva de García
3	Asia Zambrano, Ventura González y J. R. Demey
4	Asia Zambrano, Ventura González y J. R. Demey
5	Ignacio Santana, Odalis Nodarse, A. Arencibia, Ana Rodríguez
6	Efraín Salazar y José Sarga, 1988.
7	Efraín Salazar y José Sarga, 1986.
8	J. Pérez Ponce, Universidad central de Las Villas, Cuba.
9	Tesis de Mario Peña, Zamorano 1997.

Anexo 1 – B Tipos de explantes utilizados

1	Hojas inmaduras o jóvenes. 2 cm. por debajo y 2 cm. por encima de la región apical
2	Hojas jóvenes, 5 cm. de largo a partir del último nudo.
3	Hojas jóvenes, secciones del apicifolio (5 cm. de largo y 2 cm. de diámetro), meristema apical
4	Callo embriogénico
5	Hojas jóvenes, diámetro de 8-12 cm.
6	Fragmentos de tallo de 1 cm ³
7	Yemas terminales
8	Hojas jóvenes, meristemas de 0.5 cm. de diámetro
9	Yemas axilares

Anexo 1 – C Procedimiento de desinfección

1	No hay reporte.
2	Lavado con abundante agua y jabón, y sometido a una desinfección con cloro comercial al 20% durante 20 minutos.
3	Humedecer en etanol e inmediata sumergir en hipoclorito de sodio al 5% por 20 min., en cámara de flujo laminar. Posteriormente lavar el material, por tres veces consecutivas, con agua desmineralizada, destilada y estéril.
4	
5	
6	Lavar con detergente comercial y con abundante agua potable. Inmediatamente, los trozos de tallo someterlos durante 20 minutos a un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) a las dosis de 1, 4, 8, 10 y 20%. Concluido el tiempo de inmersión, el material vegetal se debe lavar tres veces sucesivas con agua destilada estéril, en una cámara de flujo laminar.
7	Lavar con un detergente comercial durante varios minutos, removiéndose el exceso del mismo con agua potable. Posteriormente, se colocaron en baño de María a una temperatura de 50°C durante una hora, sumergiéndose seguidamente en una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 60 minutos.
8	Alcohol al 70%, Hipoclorito de Ca al 10%
9	Alcohol al 70% por 20 segundos, solución de hipoclorito de Na al 1% por 20 min. y unas gotas de Tween 80. Enjuagar tres veces el material en la cámara de flujo laminar con agua bidestilada estéril para remover los productos desinfectantes.

Anexo 1 – D Hormonas suplementadas

1	2,4-D (5 mg/L)	
2	2,4-D (13 µM)	
3	2,4-D (3 mg/L)	
4	2,4-D (3 mg/L)	
5	2,4-D (5 mg/L)	
6	AIB (1-3 mg/L) y AIA (3 mg/L)	
7	AIA, AIB, ANA a concentraciones de 0,2, 1,0 y 3,0 mg/L cada uno.	
8	1 mg/L AIB;	
9	2,4-D (1-3 mg/L), ANA (1-3 mg/L)	BAP (2 y 4 mg/L)

Anexo 1 – E Formulaciones nutritivas

	Medio de cultivo	Antioxidante
1	Payan	
2	MS	
3	MS (1962), modificado por LIU (1984).	
4	MS líquido (1962), modificado por LIU (1984).	
5	Payan	
6	MS	
7	MS (1962)	Dietil ditio de carbonato de Na (2 mg/L)
8	White (1963) líquido	Ditiotreitol (0.01 molar)
9	MS	Ácido cítrico (100 mg/L), Cisteína (50 mg/L)

Anexo 1 – F Suplementos en el medio de cultivo

1	5 mg/l de 2,4-D y 18 % de agua de coco.
2	13 μ M de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)
3	100 mg/L de mioinositol; 1 mg/L de tiamina-HCl; 0.5 mg/L de ácido nicotínico; 0.5 mg/L de piridoxina; 2 mg/L de glicina; 50 mg/L de arginina; 3 mg/L de 2.4-D; 400 mg/L de caseína hidrolizada; 50 ml/L de agua de coco; 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar.
4	100 mg/L de mioinositol; 1 mg/L de tiamina-HCl; 0.5 mg/L de ácido nicotínico; 0.5 mg/L de piridoxina; 3 mg/L de 2.4-D; 400 mg/L de caseína hidrolizada; 100 ml/L de agua de coco; 20 g/L de sacarosa.
5	5 mg/l de 2,4-D y 18% de agua de coco.
6	Tiamina-HCl (0, mg/L), píridoxina (1 mg/L), ácido nicotínico (1 mg/L), mioinositol (1 00 mg/L) y sacarosa (3%).
7	Tiamina HCl (0,1 mg/L), mioinositol (100 mg/L) y sacarosa (30 mg/L).
8	2 mg/L glicina, 1.07 mg/L cinetina, 100 mg/L mioinositol, 10% agua de coco, 20 g/L sacarosa, 0.5 mg/L ácido giberélico
9	100 mg/L de mioinositol, 50 mg/L de cisteína, 20 g/L de sacarosa,

Anexo 1 – G Vía de regeneración

	Vía de regeneración	Resultado
1	Embriogénesis indirecta	Formación de callos
2	Embriogénesis indirecta	Callo embriogénico
3	Embriogénesis indirecta	Callo embriogénico
4	Embriogénesis indirecta	Suspensión celular
5	Ápices meristemáticos	Formación de callos
6	Ápices meristemáticos	Explantos libre de contaminación
7	Ápices meristemáticos	Regeneración de plantas
8	Ápices meristemáticos	Inducción de ahijamiento
9	Ápices meristemáticos	Formación de callos

Anexo 2. Siembra de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.



Preparación de yemas axilares a nivel de cámara de flujo laminar, con ayuda de un estereoscopio



Extracción de brácteas de yemas axilares



Esterilización de instrumentos y contenedores al momento de siembra



Siembra de yemas axilares en tubos individuales



Yemas axilares en el cuarto de crecimiento después de siembra

Anexo 3. Siembra de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.



Desinfección de explantes foliares con hipoclorito de sodio



Enjuagues de explantes foliares con agua destilada estéril a nivel de cámara de flujo laminar



Preparación de explantes foliares



Corte de explantes foliares



Siembra de explantes foliares

Anexo 4. Esquema del primer experimento: Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Hormonas		Repetición		
	mg/L		Yemas axilares		
	BAP	2,4-D			
1	2.0	2.0	1	2	3
2	4.0	2.0	1	2	3

Anexo 5. Esquema del segundo experimento: Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Hormonas		Repetición					
	mg/L		Hojas sin abrir			Hojas recién abiertas		
	2,4-D	Dicamba						
1	3.0	0.0	1	2	3	1	2	3
2	0.0	6.6	1	2	3	1	2	3
3	2.9	0.0	1	2	3	1	2	3