

**Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)
-variedad CP 72-2086-**

Johana Gicela Parreño Humanante

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)
-variedad CP 72-2086-**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Johana Gicela Parreño Humanante

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

**Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)
-variedad CP 72-2086 -**

Presentado por:

Johana Gicela Parreño Humanante

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

Abel Gernat, Ph. D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Rafael Solorzano, Ing. Agr.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora

RESUMEN

Parreño Humanante, J.G. 2012. Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) -variedad CP 72-2086 -. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 24 p.

La caña de azúcar *Saccharum officinarum* pertenece a la familia Poaceae. Es un cultivo a nivel mundial como fuente de azúcar. Existen otros productos como aguardiente, alcohol y melaza. Actualmente ha pasado a ser una fuente de derivados y objeto de múltiples investigaciones científicas y tecnológicas. La propagación convencional se ve limitada por la obtención de semillas, multiplicación rápida y semilleros puros. Por esto, la propagación *in vitro* es de gran importancia, ya que se puede obtener plantas libres de patógenos y propagación masiva. Se utilizó la -variedad CP 72-2086- de las fincas del Ingenio Azucarero Tres Valles, por ser una variedad precoz de alto rendimiento. Los objetivos fueron determinar el mejor medio de cultivo para el establecimiento *in vitro*, reducir la oxidación fenólica de los explantes y se evaluó el número de brotes en la etapa de multiplicación, subcultivo dos. El mejor medio de cultivo para el establecimiento de caña de azúcar fue el de Murashige y Skoog (1962) modificado, con mayor desarrollo y menor fenolización del meristemo apical. No es necesaria la utilización de antioxidantes suplementados al medio de cultivo. En la etapa de multiplicación a los 42 días no se observó diferencia en el número de brotes al añadir ácido ascórbico al medio de cultivo, obteniendo un brote de cada meristemo. Se debe continuar el experimento hasta evaluar el rendimiento de la planta obtenida *in vitro*, realizando parcelas en campo.

Palabras clave: Antioxidantes, BAP, brotes, explante, fenolización, meristemo apical.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4. CONCLUSIONES.....	19
5. RECOMENDACIONES.....	20
6. LITERATURA CITADA.....	21
7. ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros		Página
1.	Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (1962) modificado, suplementado con 0.026 mg/L de BAP para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar.....	5
2.	Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (1962) modificado, con sales minerales a la mitad de la concentración, suplementado con 0.026 mg/L de BAP para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar	6
3.	Medio de cultivo basal y vitaminas de White (1963) para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar	7
4.	Medio de cultivo basal y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) modificado, suplementado con 0.2mg/L de BAP para la multiplicación <i>in vitro</i> de caña de azúcar	11
5.	Efecto de tres medios de cultivo en la oxidación de meristemos apicales de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-, 35 días después de establecimiento.	15
6.	Influencia de tres medios de cultivo en la sobrevivencia de meristemos apicales de caña de azúcar –variedad CP 72-2086-, 35 días después de establecimiento.	16
7.	Efecto de tres antioxidantes en el control de fenolización en caña de azúcar	17
8.	Efecto del ácido ascórbico, suplementado en el medio de cultivo en el número de brotes producidos a los 42 días en la etapa de multiplicación de caña de azúcar.	18
Figuras		Página
1.	Proceso de obtención del ápice ubicado en el verticilo caulinar de caña de azúcar de la -variedad CP 72-2086-.....	4
2.	Extracción y siembra del meristemo apical de caña de azúcar.....	8
3.	Cambio de medio líquido a sólido para etapa de multiplicación en caña de azúcar.	12
4.	Etapas de multiplicación (42 días), en caña de azúcar	12

5.	Desarrollo del meristemo apical de caña en tres medios de cultivo a los 35 días después de establecimiento	14
6.	Oxidación de meristemos apicales en medio de cultivo White (1963)	15
7.	Desarrollo de meristemos apicales con tres antioxidantes añadidos al medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) (Kyte 1987), en el control de fenolización en caña de azúcar	17
8.	Meristemos apicales de caña de azúcar en etapa de multiplicación	18

Anexos	Página	
1.	Contaminación ocasionada por bacterias y hongos en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de meristemos apicales de caña de azúcar	23
2.	Número de brotes de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-, a los 42 días en etapa de multiplicación.	23

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es originaria de Nueva Guinea. Pertenece a la familia de las gramíneas, las variedades cultivadas comercialmente pertenecen a la especie *Saccharum officinarum*, se propaga convencionalmente de manera vegetativa por medio de estacas o esquejes (Sánchez 1999).

El aumento en la producción mundial de azúcar se debe a la introducción de cultivares mejorados (Jackson 2005). Los cultivares modernos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) plantados en el mundo resultaron del intercruzamientos a partir de la primera cruce interespecífica llevada a cabo al principio del siglo pasado, entre *S. officinarum*, *S. spontaneum* y *S. barberi* (Grivet y Arruda 2002).

Las variedades modernas de caña de azúcar son obtenidas a través de la selección, este proceso dura entre 8-10 años. Los métodos convencionales para la obtención de semilla de caña de azúcar seleccionada son lentos. Considerando que los productores requieren de una multiplicación rápida, suficiente semilla y semilleros puros de la nueva variedad, el cultivo de tejidos es una herramienta útil para la propagación masiva de variedades de caña de azúcar (Singh *et al.* 2001).

La caña es el cultivo primario de azúcar a nivel mundial. La producción actual se ubica en 1,450 millones de toneladas de azúcar de 22 millones de hectáreas alrededor del mundo. Los países productores líderes son Brasil e India, con aproximadamente 60% de la producción mundial (NETAFIM 2012).

La agroindustria azucarera de Honduras está conformada por siete ingenios, entre ellos el Ingenio Tres Valles, y 10,000 productores independientes, produciendo 414 millones de kilogramos de azúcar al finalizar la zafra del 2011. Se cuenta con una superficie total de producción de caña de azúcar de 92,950 hectáreas, de las cuales el 55% pertenece a la industria y el 45% a productores independientes. A corto plazo la industria azucarera pretende alcanzar la meta de producción anual de 460 millones de kilogramos de azúcar, es por esto que pretenden usar variedades de gran rendimiento (SAG 2012).

La variedad 'CP72-2086' fue seleccionada de una progenie proveniente del cruce entre 'CP62-374' x 'CP63-588' realizado en 1967 y desarrollada a través de la investigación cooperativa entre la United State Department of Agriculture - Agricultural Research Service, la Universidad de Florida y la Liga de Cañicultores de Florida y fue liberada a la industria azucarera en 1972. En Latinoamérica fue introducida en México. Es la variedad

precoz más difundida en México y Centroamérica, con un porcentaje de contenido de sacarosa de 13.19% y rendimiento de 120 Ton/ha (De Souza *et al.* 1994).

Las investigaciones en especies híbridas de caña de azúcar y su reproducción por cultivo de tejidos y células empezaron en Hawaii en 1961 por Nickell. El cultivo de tejidos es actualmente usado para el mejoramiento y propagación de caña de azúcar (Naik 2001). Los meristemos apicales se han usado comúnmente para propagación, debido a que se encuentran libres de virus y patógenos (Cheong *et al.* 2012).

Existen numerosos protocolos para la propagación *in vitro* de caña de azúcar que han sido investigados y modificados a lo largo del tiempo, adaptados para la variedad a ser propagada. Para la micropropagación de caña de azúcar casi todos los laboratorios usan el medio modificado Murashige y Skoog. Este medio es caracterizado por altas concentraciones de sales minerales (Naik 2001). También se ha usado el medio modificado White (1963) (Jalaja *et al.* 2008).

La oxidación fenólica en caña de azúcar ocurre en las heridas causadas por el corte de tejidos jóvenes, inhibiendo el desarrollo y provocando la muerte de los explantes. Para reducir este efecto, Enríquez (1997) y Arencibia (1997) recomiendan la utilización de agentes químicos antifenolizantes al momento de la incisión. Azofeifa (2009) señala que los antioxidantes más empleados, para el cultivo de células vegetales *in vitro*, son el ácido ascórbico, ácido cítrico y cisteína, ya sea solos o en mezcla.

El medio de cultivo líquido permite que la oxidación producida por la liberación de fenoles del explante de caña de azúcar, se distribuya en todo el medio evitando su muerte; la respuesta del explante es influenciada por la variedad de caña. Si la oxidación es muy fuerte, es necesario realizar cambios de medio de cultivo incluso después de pocos días de sembrado el explante (Chavarria 1999).

En el presente estudio se realizaron tres experimentos con los siguientes objetivos:

- Determinar el mejor medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.
- Reducir la oxidación fenólica en la -variedad CP 72-2086-.
- Evaluar el número de brotes en los dos primeros subcultivos de la etapa de multiplicación, utilizando el mejor medio y agente antioxidante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería Agronómica del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle de Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Material vegetal y fuente de explante. Se utilizaron meristemos apicales de caña de azúcar -variedad CP 72-2086- procedente de las fincas del Ingenio Tres Valles.

Experimento 1: Selección de medio basal para establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-: Desinfección del explante. Se utilizó como fuente de explante el ápice, que es donde se encuentra localizado el meristemo apical. El ápice está ubicado dentro del verticilo caulinar de la planta (Figura 1). El ápice se desinfectó en una solución de NaClO al 1% (v/v) (hipoclorito de sodio al 4.5% de ingrediente activo) con dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml, durante cinco minutos. Después se colocó en baño maría, con agua destilada estéril, durante ocho minutos, 50-55 °C, y se colocó en solución de ácido cítrico (0.2g/L), por cinco minutos. Finalmente se sumergieron los ápices en una solución de NaClO al 1% (v/v) (hipoclorito de sodio al 4.5% de ingrediente activo), por 15 minutos a nivel de cámara de flujo laminar horizontal.

Preparación de los Medios de Cultivo. Se utilizó tres medios de cultivos, dos basados en el de Murashige y Skoog (MS) (1962) (Kyte 1987), utilizando las sales de Murashige y Skoog y suplementado con 0.026 mg/L de BAP (Cuadro 1 y 2), y otro basado en la formulación de White (1963) (Jalaja *et al.* 2008) (Cuadro 3). Para la preparación de todas las soluciones y medios de cultivos se utilizó agua destilada, el pH se ajustó a 5.8, con HCL y/o KOH, se esterilizó en autoclave a 15 PSI, 121°C por 20 minutos.

Preparación y siembra del material vegetal. La cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 70%, las herramientas se esterilizaron a 250°C en el esterilizador de calor seco, después se extrajo el meristemo apical desprendiendo las hojas de envoltura hasta dejarlo cubierto únicamente con dos hojas. El meristemo extraído se colocó en frascos con 2 ml de medio, se sellaron y se incubaron en el cuarto de crecimiento a 22°C, 60% de humedad relativa y 16 horas luz (Silvanya Daylight Incandescent 75 W) con una intensidad de 1800 Lux (Figura 2).



Figura 1. Proceso de obtención del ápice ubicado en el verticilo caulinar de caña de azúcar de la -variedad CP 72-2086-, A) planta madre, B) remoción de hojas hasta obtener el verticilo caulinar, C) verticilo caulinar de 20 cm, D) deshoje del verticilo caulinar, E) remoción de la base del ápice, F) corte a 7 cm del ápice, G) ápice.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (1962) modificado, suplementado con 0.026 mg/L de BAP para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina-HCL	1.000
		BAP	0.026
		Sacarosa	20,000.00

Fuente: Kyte 1987.

Cuadro 2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (1962) modificado, con sales minerales a la mitad de la concentración, suplementado con 0.026 mg/L de BAP para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	220.0000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	85.0000
	KNO_3	Nitrato de potasio	950.0000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.0000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	825.0000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	3.1000
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0125
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.0125
	KI	Yoduro de potasio	0.4150
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	11.1500
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0.1250
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	4.3000
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	25.0000
Componentes orgánicos		Myo-inositol	100.0000
		Tiamina-HCL	1.0000
		BAP	0.0260
		Sacarosa	20,000.00

Fuente: Kyte 1987.

Cuadro 3. Medio de cultivo basal y vitaminas de White (1963) para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de calcio tetrahidratado	200.00
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	360.00
Macroelementos	KCl	Cloruro de potasio	65.00
	KNO_3	Nitrato de potasio	80.00
	Na_2SO_4	Sulfato de sodio	200.00
	H_3BO_3	Ácido bórico	1.50
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	5.00
Microelementos	KI	Yoduro de potasio	0.75
	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato de sodio monohidratado	16.40
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	3.00
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	25.00
		Ácido Nicotínico	0.50
Componentes orgánicos		Piridoxina	0.50
		Tiamina-HCL	0.10
		Glicina	3.00
		Sacarosa	20000.00

Fuente: Jalaja *et al.* 2008.

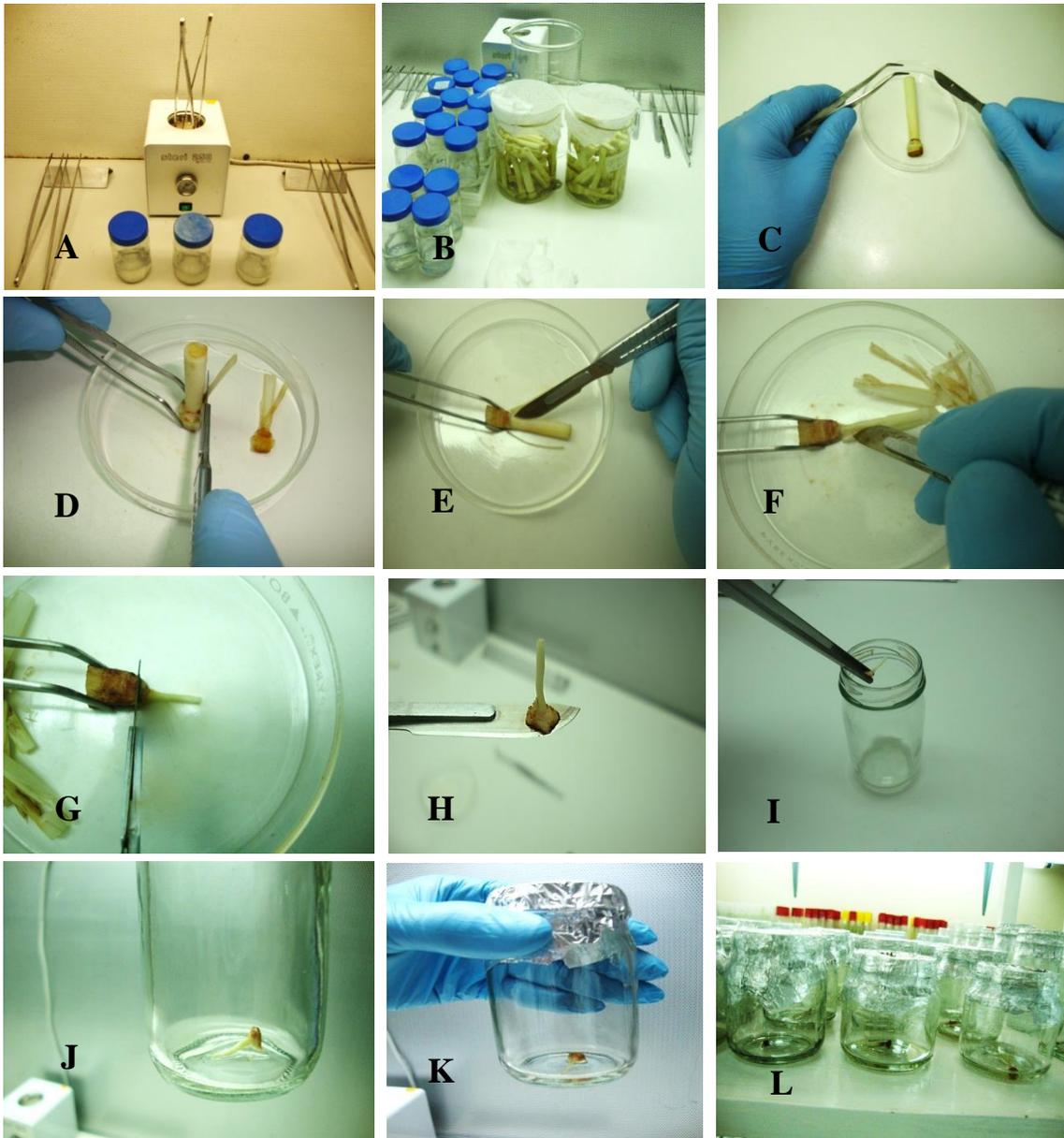


Figura 2. Extracción y siembra del meristemo apical de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-, A) cámara de flujo laminar, esterilizador, pinzas y medio de cultivo, B) ápices en solución de NaOCl, C) ápice, D) corte de hojas del ápice para extracción del meristemo apical, E) y F) remoción de hojas del ápice hasta 1 cm de largo, G) corte de la base del ápice, H) meristemo apical, I) introducción del meristemo apical en el medio de cultivo, J) meristemo apical en el medio de cultivo, K) tapado y sellado del frasco de incubación, L) frascos en incubación en el cuarto de crecimiento.

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA), teniendo tres tratamientos con cuatro repeticiones y cada repetición con cinco unidades experimentales. Se realizó el análisis de varianza ANDEVA, y una separación de medias con el método de DUNCAN con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]) (SAS 2009).

Datos evaluados. Cada cinco días se realizó el cambio de los tres medios líquidos, desde etapa de establecimiento inicial hasta llegar a los 35 días, donde se evaluó cada día el número de contaminados y oxidados. La variable medida fue el porcentaje de oxidación y ápices vivos al finalizar la etapa de establecimiento en cada tratamiento.

Experimento 2. Reducción de oxidación en caña de azúcar -variedad CP 72-2086- usando agentes antioxidantes en la preparación del explante y suplementados en el medio de cultivo: Desinfección del explante. Se utilizó como fuente de explante el ápice, que es donde se encuentra localizado el meristemo apical. El ápice está ubicado dentro del verticilo caulinar de la planta (Figura 1). Antes de proceder a la desinfección, los ápices se introdujeron en una solución de antioxidante de 300 mg/L de ácido ascórbico más 300 mg/L de ácido cítrico, durante una hora. Luego se desinfectó en una solución de NaClO (hipoclorito de sodio al 4.5% de ingrediente activo) al 1% (v/v) con dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml, durante cinco minutos. Después se colocó en baño maría, con agua destilada estéril, a 50-55 °C por ocho minutos, luego se colocó en una solución de antioxidante con 100mg/L de ácido ascórbico más 150 mg/L de ácido cítrico, durante cinco minutos. Finalmente se sumergieron en una solución NaClO (hipoclorito de sodio al 4.5% de ingrediente activo) al 1% (v/v), por 15 minutos a nivel de cámara de flujo laminar horizontal.

Preparación de los Medios de Cultivo. Se utilizó cuatro medios de cultivos, basados en Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado (Cuadro 1), el primero sin agente antioxidante y tres suplementados con 20 mg/L de cisteína, 50 mg/L de ácido cítrico o 50 mg/L de ácido ascórbico. Para la preparación de todas las soluciones y medios de cultivos se utilizó agua destilada, el pH se ajustó a 5.8, con HCL y/o KOH, se esterilizó en autoclave a 15 PSI, 121°C por 20 minutos.

Preparación y siembra del material vegetal. Se realizó el mismo procedimiento que el experimento 1.

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro repeticiones y cada repetición con tres unidades experimentales. Se realizó el análisis de varianza ANDEVA, y una separación de medias con el método de DUNCAN con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]) (SAS 2009).

Datos evaluados. La variable medida fue el porcentaje de oxidación en cada tratamiento al finalizar la etapa de establecimiento a los 25 días, después de realizar cambio de medio líquido suplementado con los antioxidantes cada cinco días.

Experimento 3. Evaluación del número de brotes en etapa de multiplicación en el subcultivo dos de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-: Preparación de los Medios de Cultivo. Se utilizó dos medios de cultivos sólidos, basados en Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado (Cuadro 4), para etapa de multiplicación, suplementado con 0.2 mg/L de BAP (Jalaja *et al.* 2008), uno de ellos suplementado con 50 mg/L de ácido ascórbico y el otro sin ácido ascórbico. Para la preparación de todas las soluciones y medios de cultivos se utilizó agua destilada, Phytigel[®] 1.8 g/L, el pH se ajustó a 5.8, con HCL y/o KOH, se esterilizó en el autoclave a 15 PSI, 121°C por 20 minutos.

Cuadro 4. Medio de cultivo basal y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) modificado, suplementado con 0.2mg/L de BAP para la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar-variedad CP72-2086-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	440.00
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.00
	KNO_3	Nitrato de potasio	1,900.00
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.00
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1,650.00
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.20
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.83
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.30
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0.25
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.60
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.00
Componentes orgánicos		Myo-inositol	100.00
		Tiamina-HCL	1.00
		BAP	0.20
		Piridoxina	0.50
		Glicina	2.00
		Ácido Nicotínico	0.50
		Sacarosa	20,000.00

Fuente: Kyte 1987.

Cambio de medio. El cambio de medio de etapa de establecimiento (I) (medio líquido) a etapa de multiplicación (II) (medio sólido) (Figura 3), se realizó después de los 35 días en el experimento uno y 25 días en el experimento dos, de establecimiento inicial. En establecimiento se realizó el cambio de medio cada cinco días. En etapa de multiplicación se realizó el cambio de medio sólido cada 21 días hasta llegar a la etapa II.2, 42 días después de cambio de medio (Figura 4).

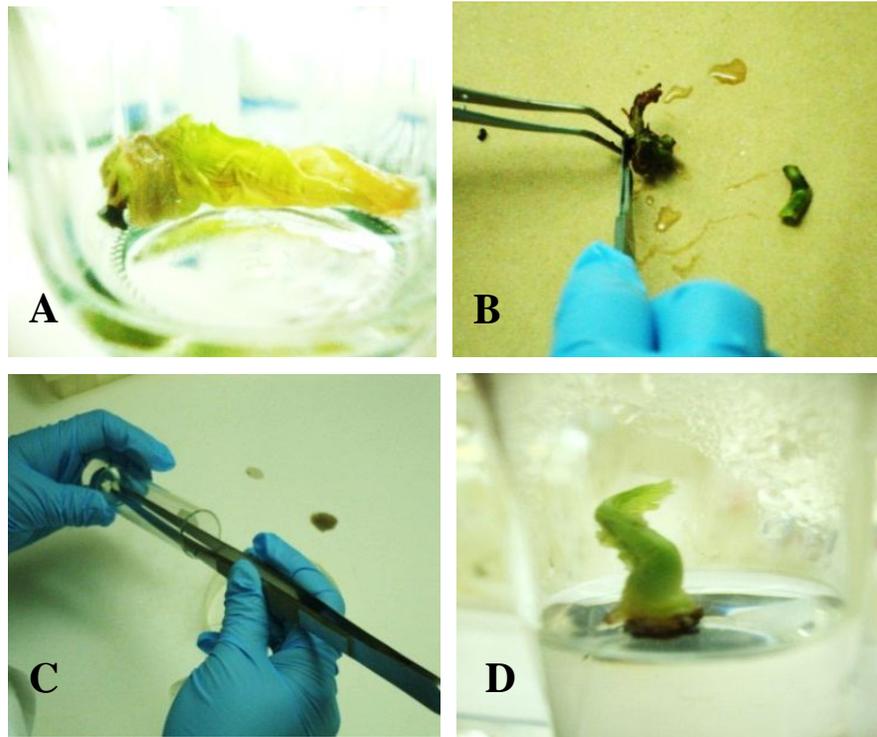


Figura 3. Cambio de medio líquido a sólido para etapa de multiplicación en caña de azúcar -variedad CP 72-2086- A) meristemo apical 25 días después de establecimiento en medio líquido, B) eliminación de hojas, C) cambio de medio líquido a sólido, D) meristemo apical en medio sólido etapa II.



Figura 4. Etapa de multiplicación (42 días), en caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.

Análisis estadístico. Se utilizó una Prueba t, con un nivel de significancia de ≤ 0.05 . Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]) (SAS 2009).

Datos evaluados. Se evaluó el número de brotes provenientes de un meristemo apical a los 42 días de cambio de etapa de establecimiento a etapa de multiplicación, en el medio modificado de Murashige y Skoog (1962), con y sin ácido ascórbico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1: Selección de medio basal para establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-: Los meristemos apicales sembrados en los tres medios probados, presentaron crecimiento y desarrollo al llegar a los 35 días después de la siembra en etapa de establecimiento. Se observó mayor desarrollo en los meristemos apicales establecidos en los medios con concentración normal y a la mitad de sales minerales de Murashige y Skoog (1962) modificado (Figura 5). Es importante aplicar la concentración adecuada de BAP (0.02- 0.05 mg/L). Azofeifa (2009) observó la fenolización de brotes apicales cuando utilizó altas concentraciones de BAP, además se pueden producir mutaciones.

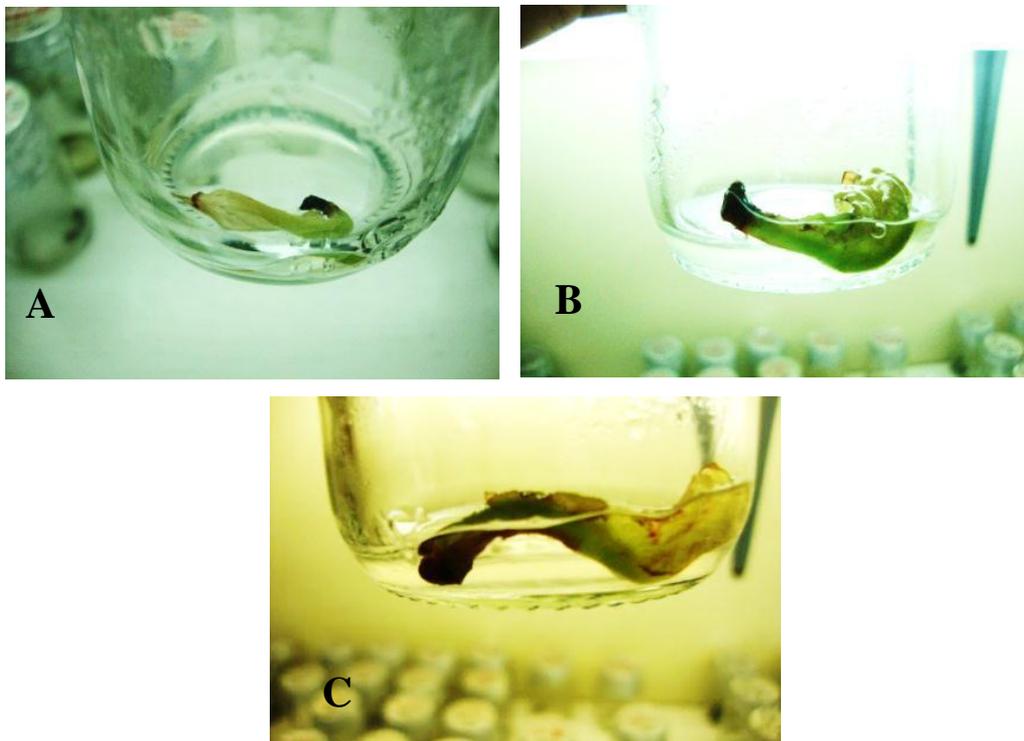


Figura 5. Desarrollo del meristemo apical de caña en tres medios de cultivo a los 35 días después de establecimiento, A) medio de cultivo White (1963) (Jalaja *et. al* 2008), B) medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado con mitad de concentración de sales minerales, C) medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado.

Se observó el mayor número de meristemos apicales oxidados (Figura 6) al finalizar la etapa de establecimiento en el medio de cultivo White (1962) (Cuadro 5). Azofeifa (2009) señala que la oxidación y muerte de tejidos es con frecuencia más pronunciado en un tipo de medio de cultivo que en otro.

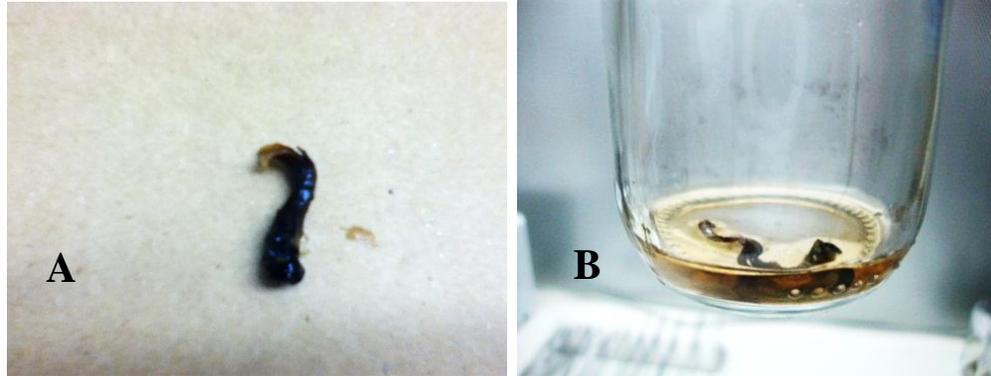


Figura 6. Oxidación de meristemos apicales en medio de cultivo White (1963) (Jalaja *et al.* 2008), A) meristemo apical oxidado, B) oxidación y muerte de meristemo apical en medio de cultivo.

Los mejores resultados en el menor porcentaje de oxidación y mayor porcentaje de sobrevivencia de meristemos apicales se obtuvieron utilizando el medio modificado de Murashige y Skoog (1962) en concentración normal y mitad de sales minerales en comparación al medio White (1963) (Cuadros 5 y 6). Se demostró al igual que Naik (2001) que el medio MS en comparación con el medio White (1963) es mejor para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar. Este resultado se puede deber a que el medio White (1963) no posee Myo-inositol que estimula la división celular.

Cuadro 5. Efecto de tres medios de cultivo en la oxidación de meristemos apicales de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-, 35 días después de establecimiento.

Medios de cultivo	Explantos oxidados (%)
Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado	16.25 ^{at}
½ Murashige y Skoog(1962) (Kyte 1987) modificado	27.50 ^a
White (1963) (Jalaja <i>et al.</i> 2008)	60.00 ^b

£= Los promedios con letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan con una probabilidad ≤ 0.05 .

Con frecuencia la fenolización es menor en un medio diluido que uno alto en sales. Para contrarrestar este efecto se evitó la oxidación en brotes apicales de caña de azúcar mediante el empleo de un MS diluido en la concentración de sus sales minerales. Pérez Ponce (1993) determinó que en el medio White (1963) hasta un 100% de los explantes de

caña de azúcar produjeron fenoles, la causa podría ser que posee glicina en su composición y puede ser tóxico en algunos cultivos como en caña de azúcar.

También se observó que no existe diferencia significativa en el porcentaje de sobrevivencia entre los meristemos apicales establecidos en los medios de Murashige y Skoog (1962), pero se puede observar diferencia significativa en comparación con los meristemos apicales establecidos en el medio de White (1963) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Influencia de tres medios de cultivo en la sobrevivencia de meristemos apicales de caña de azúcar –variedad CP 72-2086-, 35 días después de establecimiento.

Medios de cultivo	Explantos vivos (%)
Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado	55.00 ^{aΩ}
½ Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado	52.50 ^a
White (1963) (Jalaja <i>et al.</i> 2008)	10.00 ^b

Ω= Los promedios con letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan con una probabilidad ≤ 0.05 .

En la etapa de establecimiento de caña de azúcar -variedad CP 72-2086- se observó contaminación en los tres medios de cultivo causada por hongos y por bacterias (Anexo 1). Según Alvarado *et al.* (2003) cualquier pequeño cambio en las condiciones del medio ambiente *in vitro* (pH, temperatura, composición del medio de cultivo, manipulación de los explantes) puede hacer que los contaminantes latentes proliferen rápidamente.

Experimento 2. Reducción de oxidación en caña de azúcar -variedad CP 72-2086- usando agentes antioxidantes en la preparación del explante y suplementados en el medio de cultivo: Según Azofeifa (2009) en la etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes algunas veces es necesario agregar al medio de cultivo un antioxidante que retarde o evite la oxidación, sea del meristemo apical o del medio de cultivo.

A diferencia de los resultados obtenidos por Valdez Balero *et al.* (2002), donde utilizaron los mismos antioxidantes, concluyeron que la dosis de 50 mg/L de ácido cítrico añadida al medio es la mejor para combatir la fenolización en caña de azúcar; en este experimento a pesar de que al utilizar 50 mg/L de ácido ascórbico añadido al medio de cultivo los meristemos apicales no presentaron oxidación, no existió diferencia significativa con respecto a la cisteína, ácido ascórbico, ácido cítrico y no utilizar antioxidante (Cuadro 7). Estos resultados se pueden deber al cambio de protocolo de desinfección y la utilización de un menor número de plantas.

Cuadro 7. Efecto de tres antioxidantes en el control de fenolización en caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.

Tratamiento		
Antioxidantes	Dosis (mg/L)	Fenolización de explantes (%)
MS [¥]	0.00	25.00 ^{a ∞}
MS+ ácido cítrico	50.00	25.00 ^a
MS+ cisteína	20.00	25.00 ^a
MS+ ácido ascórbico	50.00	0.00 ^a

∞= Los promedios con letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan con una probabilidad ≤ 0.05 .

¥= Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) modificado.

Los meristemos apicales de caña de azúcar -variedad CP 72-2086- establecidos en medios de cultivo suplementados en el medio de cultivo con antioxidante, mostraron diferente comportamiento de acuerdo al tipo de antioxidante usado (Figura 7). Además no hubo muerte por oxidación, y la contaminación fue de un 8% ocasionada por hongos.

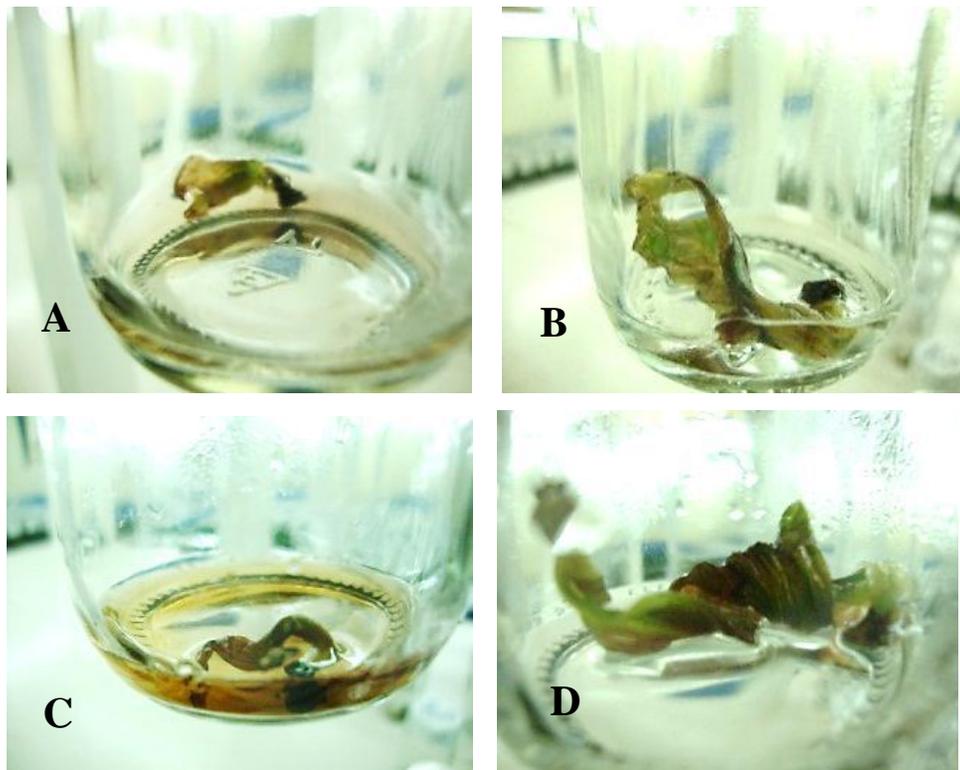


Figura 7. Desarrollo de meristemos apicales con tres antioxidantes añadidos al medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) (Kyte 1987) modificado, en el control de fenolización en caña de azúcar -variedad CP 72-2086-, A) MS, B) MS+ ácido cítrico (50 mg/L), C) MS + cisteína (20 mg/L) y D) MS+ ácido ascórbico (50mg/L).

Experimento 3. Evaluación del número de brotes en etapa de multiplicación en el subcultivo dos de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-: En la etapa de multiplicación, 42 días después de cambio de medio, se realizó el conteo de brotes en el medio de Murashige y Skoog con y sin ácido ascórbico. Se determinó por medio de una prueba t, que no existe diferencia entre utilizar medio con antioxidante o sin antioxidante para estimular el número de brotes (Cuadro 8) hasta la etapa ya mencionada. También se observó que no se redujo la oxidación al utilizar ácido ascórbico como antioxidante (Figura 8), igualmente existió contaminación causada por hongos y bacterias, lo que produjo la muerte de algunos meristemos.

Cuadro 8. Efecto del ácido ascórbico, suplementado en el medio de cultivo en el número de brotes producidos a los 42 días en la etapa de multiplicación de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.

Medio de cultivo	Media	Valor t	Explantos	Pr > t
MS ^Ω	1.273	1.890	11	0.0745
MS+ ácido ascórbico	0.500	1.930	10	0.0706

Ω= Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987).

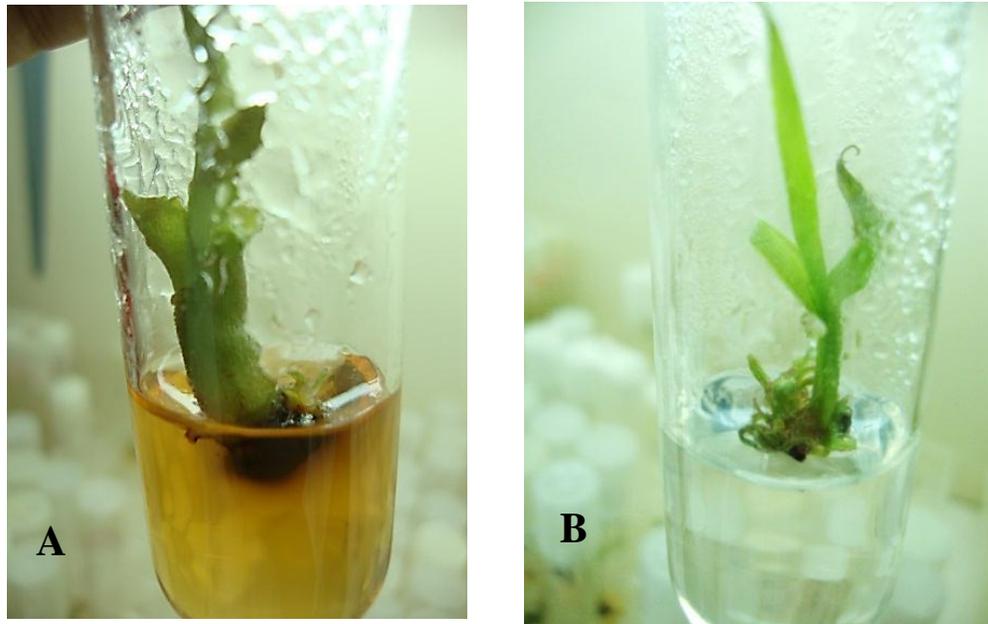


Figura 8. Meristemos apicales de caña de azúcar -variedad CP 72-2086- en etapa de multiplicación A) oxidación en medio de Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) más ácido ascórbico, B) medio Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) sin antioxidante.

4. CONCLUSIONES

- El establecimiento *in vitro* caña de azúcar -variedad CP 72-2086- se logró con menos porcentaje de oxidación y mayor desarrollo de meristemo apical en el medio modificado de Murashige y Skoog (1962) modificado, determinando de este modo que es el mejor medio de cultivo.
- Usando ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína y no usando agente antioxidante, suplementados en el medio no existieron diferencias significativas en el porcentaje oxidación, por lo tanto no es recomendable utilizar antioxidante. Se debe tener mayor énfasis en el manejo y manipulación del explante.
- A los 42 días se observó que no existe diferencia en el número de brotes, al añadir antioxidante o no añadir antioxidante en la etapa multiplicación, obteniendo un brote de cada meristemo en ambos medios, por lo que no es necesario la suplementación de antioxidante al medio, pero sí al proceso de desinfección.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar en el proceso de desinfección una inmersión de ácido cítrico (300 mg/L) más ácido ascórbico (300mg/L) para reducir la oxidación en los ápices de caña de azúcar.
- Continuar el experimento para determinar el número de brotes en toda la etapa de multiplicación, seguir con la etapa de enraizamiento y aclimatación; monitorear en el campo para medir adaptabilidad, rendimientos y observar si no existen mutaciones.
- Seleccionar plantas madres en estado vegetativo (4 meses), observar los resultados en cuanto a su desarrollo y multiplicación

6. LITERATURA CITADA

Alvarado, Y., Portal, N., García, L., Ramírez, D. y Martínez, Y. 2003. Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Villa Clara, Cuba. *Biotecnología vegetal* 3(1):31-36.

Arencibia, A. 1997. Transformación directa de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) mediante electroporación de células intactas: producción de plantas resistentes al ataque de bórer (*Diatraea saccharalis* Fab). Tesis de Doctorado en Ciencias. La Habana, Cuba. 15 p.

Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro* (en línea). *Agronomía Mesoamericana*. Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Vol. 20, Núm. 1. 153-175 pp. Consultado el 30 de agosto del 2012. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=43711514016>

Chavarria, E. 1999. Protocolo para la reproducción masiva *in vitro* de caña de azúcar en Costa Rica. XI Congreso Nacional Agronómico. Resumen 164. p 208.

Cheong, E., Mock, R. y Li, R. 2012. Elimination of five viruses from sugarcane using in vitro culture of axillary buds and apical meristems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109: 439-445.

De Souza, O., González, V. y Rea, R. 1994. Caracterización de catorce variedades promisoras de caña de azúcar en Venezuela (en línea). *Biotecnología Vegetal*. 12(1): 3-45. Consultado el 09 de Julio del 2012. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/canadeazucar/cana1201/texto/caracterizacion.htm

Enríquez, G. 1997. Genetics transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnology Application*. 14: 169-174.

Grivet, L. y Arruda, P. 2002. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 122-12.

Jackson, P. 2005. Breeding for improved sugar content in sugarcane. CSIRO Plant Industry, Davies Laboratory. Australia. *Field Crops Research* 92: 277-290.

Jalaja, N., Neelamathi, D. y Sreenivasan, T. 2008. Micropropagation for Quality Seed Production in Sugarcane in Asia and the Pacific. (FAO) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome; Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, New Delhi; Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, Bangkok. p. 7- 40

Kyte, L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micro propagation. Portland, Oregon, Timber Press. p. 160

Naik, G. 2001. Sugarcane Biotechnology. Tissue culture studies in sugarcane. SCIENCE PUBLISHERS, INC. United States of America. p. 31-35

NETAFIM. 2012. Caña de Azúcar (en línea). Consultado el 07 de octubre del 2012. Disponible en: <http://www.netafim-latinamerica.com/crop/sugarcane>

Pérez Ponce, J. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: cultivo de tejidos en la caña de azúcar. Capítulo 25. Universidad Central de las Villas. Las Villas, Cuba. p. 553- 558

Sánchez, A. 1999. Cultivos de Plantación. 2^a ed. México. Editorial Trillas, S.A. de C.V. p. 122

SAG. 2012. Producción de caña de azúcar en Honduras (en línea). Consultado el 07 de octubre del 2012. Disponible en: http://www.sag.gob.hn/index.php?option=com_content&task=view&id=3137&Itemid=1552

SAS. 2009. SAS User Guide. Statistical Analysis Institute Inc., Cary, N.C. ,United States of America.

Singh, B., Yadav, G. y Lal, M. 2001. An Efficient Protocol for Micropropagation of Sugarcane Using Shoot Tip Explants. Sugarcane Research Institute, U.P. Council of Sugarcane Research, Shahjahanpur. India. 3(3): 113-116.

Valdez Balero, A., Orellana, P., García, L., Veitia, N., Bermudez, I. García, L. y Padrón, Y. 2002. Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido var. SP 70-1284) en la formación de callos. Biotecnología Vegetal. 2:31-37.

7. ANEXOS

Anexo 1. Contaminación ocasionada por bacterias y hongos en la etapa de establecimiento *in vitro* de meristemas apicales de caña de azúcar -variedad CP 72-2086-.

Contaminación	
Hongos (%)	Bacterias (%)
75.0	25.0
60.0	40.0
83.3	16.7

Anexo 2. Número de brotes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) -variedad CP 72-2086-, a los 42 días en etapa de multiplicación.

Medio de cultivo	Meristemo apical	Brotos
MS+ ácido ascórbico	1	0
MS+ ácido ascórbico	2	0
MS+ ácido ascórbico	3	0
MS+ ácido ascórbico	4	0
MS+ ácido ascórbico	5	2
MS+ ácido ascórbico	6	1
MS+ ácido ascórbico	7	0
MS+ ácido ascórbico	8	1
MS+ ácido ascórbico	9	1
MS+ ácido ascórbico	10	0
MS	1	0
MS	2	1
MS	3	2
MS	4	0
MS	5	0
MS	6	2
MS	7	2
MS	8	2
MS	9	3
MS	10	2
MS	11	0