

**Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades  
de caña de azúcar a partir de explantes  
foliares y yemas axilares**

**José Francisco Araya Contreras**

**ZAMORANO**  
**Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Noviembre, 2006**

# **Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de caña de azúcar a partir de explantes foliares y yemas axilares**

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

Presentado por:

**José Francisco Araya Contreras**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2006

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

---

José Francisco Araya Contreras

Zamorano, Honduras  
Noviembre, 2006

**Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de caña de azúcar a partir de explantes foliares y yemas axilares**

Presentado por:

José Francisco Araya Contreras

Aprobado:

---

Dinie Espinal de Rueda, M. Sc.  
Asesor Principal

---

Alfredo Rueda, Ph.D.  
Coordinador del Área Temática  
de Fitotecnia

---

Alfredo Rueda, Ph.D.  
Asesor

---

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

---

Freddy Llive, Ing. Agr.  
Asesor

---

George Pilz, Ph.D.  
Decano Académico

---

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

## **DEDICATORIA**

A Dios padre y señor nuestro, por guiarnos a mi familia y a mí.

A mi familia, pilar fundamental en toda mi vida.

A mi hermano, quien me enseña, me guía y es mi razón de ser.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por guiarme siempre por el camino del bien, y darme el apoyo necesario en cada uno de mis pasos.

A mi hermano, por darme el apoyo y enseñarme con el ejemplo en las acciones de la vida.

A Dinie Espinal de Rueda, por tener la paciencia y sabiduría para guiarme por el camino del éxito.

A todo el personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de Zamorano, por su tiempo y ayuda en la realización del estudios, entregarme conocimiento ganado gracias a su experiencia por tanto tiempo y tener ánimo y positivismo ejemplares, entregando un grato ambiente en dicho laboratorio.

A todos mi amigos, con quienes he compartido por tantos años en mi estadía en Zamorano.

## RESUMEN

Araya Contreras, J. 2006. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de caña de azúcar, a partir de explantes foliares y yemas axilares. Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 22 p.

La caña de azúcar es un importante cultivo para muchos países de la zona tropical y subtropical. La propagación *in vitro* es una alternativa atrayente para la propagación de la caña de azúcar, ya que con esta técnica se obtienen altas tasas de propagación, además de ser muy utilizada en la ingeniería genética, para crear nuevos genotipos y obtener material libre de enfermedades. El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo adecuado para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar en la etapa de iniciación para las variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de explantes foliares y yemas axilares. Las variedades fueron sometidas a pruebas preliminares de desinfección, obteniendo menor contaminación con la exposición de los explantes foliares a un 7% de hipoclorito de sodio durante 25 minutos y 10% de hipoclorito de sodio durante 40 minutos para yemas axilares. Además, se evaluaron las secciones basal, intermedio y apical de acuerdo a su ubicación en la hoja, donde la sección apical obtuvo los menores niveles de contaminación. En las pruebas principales de establecimiento a través de yemas axilares, se evaluaron dos concentraciones de la hormona BAP (2 ó 4 mg/L) y su interacción con la hormona 2,4-D (2 mg/L), utilizando el medio líquido MS modificado. Para explantes foliares se evaluaron dos concentraciones de antioxidante cisteína (50 ó 100 mg/L); además se utilizaron los medios de cultivo de Heinz and Mee (1969) para inducción callogénica, y Payan y Tarcón (1977). En ambos ensayos se midieron las variables de contaminación, oxidación, necrosis y formación de callo. Los resultados obtenidos para contaminación en explantes foliares y en yemas axilares, fueron elevados, llegando al 100% en algunos tratamientos y superior al 60% en la mayoría restantes. En la utilización de explantes foliares se obtuvo una respuesta a la formación de callo en la variedad CG 9797, utilizando el medio de Payan y Tarcón (1977), con 50 mg/L de cisteína. Al utilizar yemas axilares, se obtuvieron buenos resultados en la formación de tejido callogénico, con tendencia a una mejor respuesta al utilizar 2 mg/L de BAP con 2 mg/L de 2,4-D.

Palabras clave: Cultivo de tejidos, inducción callogénica, organogénesis, *Saccharum officinarum*.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras.....	x
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 UBICACIÓN.....	3
2.2 MATERIAL VEGETAL.....	3
2.3 PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCIÓN.....	3
2.3.1 Pruebas preliminares de desinfección de explantes foliares.....	3
2.3.1.1 Medio de cultivo.....	4
2.3.1.2 Procedimiento de desinfección para explantes foliares.....	5
2.3.1.3 Siembra de explantes foliares.....	6
2.3.2 Pruebas preliminares utilizando yemas axilares.....	6
2.3.2.1 Medio de cultivo.....	6
2.3.2.2 Procedimiento de desinfección para yemas axilares.....	7
2.3.2.3 Siembra de yemas axilares.....	8
2.4 PRUEBAS DE ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE CAÑA DE AZÚCAR, DE LAS VARIEDADES RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797.....	9
2.4.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de explantes foliares.....	9
2.4.1.1 Sección foliar.....	9
2.4.1.2 Método de desinfección.....	9
2.4.1.3 Medio de cultivo.....	9
2.4.2 Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de yemas axilares.....	10
2.4.2.1 Procedimiento de desinfección.....	10
2.4.2.2 Medio de cultivo.....	10
2.5 SIEMBRA.....	11
Explantes foliares.....	11

Yemas axilares.....	11
VARIABLES A EVALUAR.....	11
ANÁLISIS DE LAS VARIABLES.....	12
Tratamientos para explantes foliares.....	12
Tratamientos para yemas axilares.....	12
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>13</b>
3.1 PRUEBAS DE ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE CAÑA DE AZÚCAR, DE LAS VARIEDADES RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 797.....	13
3.1.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de explantes foliares.....	13
3.1.1.1 Oxidación.....	13
3.1.1.2 Necrosis.....	14
3.1.1.3 Contaminación.....	15
3.1.2 Establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de yemas axilares.....	16
3.1.2.1 Formación de tejido callogénico.....	16
3.1.2.2 Oxidación.....	17
3.1.2.3 Necrosis.....	18
3.1.2.4 Contaminación.....	19
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>21</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>22</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1 Composición del medio de cultivo de Heinz and Mee (1969), utilizado en las pruebas preliminares de desinfección de explantes foliares de caña de azúcar, Zamorano, Honduras, 2006.....	4
2 Composición del medio de cultivo MS modificado, que se utilizó en las pruebas preliminares de desinfección de yemas axilares de caña de azúcar, Zamorano, Honduras, 2006.....	7
3 Composición del medio de cultivo de Payan y Tarcón 1977, utilizado para la inducción callogénica en explantes foliares de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, Zamorano, Honduras, 2006.....	10
4 Niveles de contaminación y sobrevivencia a las seis semanas de incubación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2006.....	16
5 Porcentaje de tejido callogénico a las seis semanas de incubación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006.....	17
6 Niveles de contaminación a las seis semanas de incubación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006.....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Niveles de oxidación severa a las semanas dos, cuatro y seis de incubación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2006.....	14
2	Niveles de necrosis alta y severa a las seis semanas de incubación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2006.....	15
3	Niveles de oxidación severa a las semanas dos, cuatro y seis de incubación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006.....	18
4	Niveles de necrosis alto y severo a las seis semanas de incubación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006. ....	19

## 1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un importante cultivo para muchos países tropicales y sub-tropicales. Una alta eficiencia fotosintética y de biomasa hacen de esta gramínea una excelente opción para el procesamiento industrial y una alternativa para la alimentación animal y la producción de sub-productos (Marcano *et al.* 2002).

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, intercambio de material genético, producción comercial de semillas y saneamiento de clones para eliminar el mosaico (*Ustilago* sp.) y la enfermedad del retoño achaparrado (Pérez 1993).

En Honduras, la producción de caña de azúcar representa una de las más importantes fuentes de ingreso, empleando alrededor del 10% de la población económicamente activa. La industria azucarera nacional cuenta aproximadamente con 46,000 hectáreas de caña, de las cuales el 49% pertenece a la industria y el 51% es propiedad de los productores, procesando en su totalidad más de 360 mil toneladas de azúcar anualmente (La Prensa 2006).

En la zona sur del país se encuentra el ingenio azucarero La Grecia, el cual procesa alrededor de 10,000 ha al año, de las cuales el 60% representa las plantaciones propias de la empresa y el 40% restante es comprado a productores pequeños de la zona. En la actualidad se cultiva únicamente la variedad CP 722086, la cual fue creada en los años setenta. Al utilizar una misma variedad por tanto tiempo representa un alto riesgo por la variabilidad genética que esto puede conllevar. Es por esto que nace la necesidad de evaluar nuevas variedades que tengan mejores rendimientos y sustituir la variedad cultivada actualmente<sup>1</sup>.

Para conseguir este objetivo, el ingenio La Grecia está evaluando cuatro variedades (RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797) las cuales han tenido buenos resultados en los parámetros que están siendo evaluados, tales como: Época de producción (tardías), sostenibilidad de la producción en la época de zafra y rendimiento (grados Brix, biomasa, sacarosa). Dentro de los nuevos ensayos a realizar, se contempla determinar la respuesta de cada una de las cuatro variedades a la propagación *in vitro*, para lo cual le fue encomendada al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación (LCTM) de Zamorano.

---

<sup>1</sup> Sánchez B. 2006. Historia de la caña de azúcar en el Ingenio La Grecia (entrevista) Ingenio La Grecia, Choluteca, Honduras.

El objetivo general del estudio, fue encontrar un protocolo adecuado para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar de las variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de explantes foliares y yemas axilares. °

Los objetivos específicos para este estudio fueron: Determinar el procedimiento de desinfección más adecuado para explantes foliares y yemas axilares, determinar la sección de la hoja, ya sea apical, intermedio o basal, que mejor responda a la propagación *in vitro*, determinar las concentraciones adecuadas de la auxina 2,4-D, y su interacción con la citocinina BAP para el establecimiento de la caña de azúcar a través de yemas axilares. Así mismo dentro de los objetivos específicos se contempló determinar la formulación nutritiva más apropiada para la propagación *in vitro* de caña de azúcar a partir de explantes foliares y evaluar estrategias para evitar o disminuir la oxidación de los explantes en el medio de cultivo, ya sea a partir de explantes foliares o yemas axilares.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 UBICACIÓN**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación (LCTM) de Zamorano, Honduras, durante los meses de mayo – octubre de 2006.

### **2.2 MATERIAL VEGETAL**

El estudio se realizó utilizando como explantes yemas axilares y secciones foliares de caña de azúcar, de las variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797. Este material se obtuvo en el Ingenio Azucarero La Grecia, ubicado en el departamento de Choluteca, Honduras. Se utilizaron plantas de aproximadamente seis meses de edad, las cuales tienen entre seis a ocho yemas axilares por caña. Los explantes foliares fueron extraídos de las mismas plantas, cortando hojas jóvenes.

### **2.3 PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCIÓN**

#### **2.3.1 Pruebas preliminares utilizando explantes foliares**

Para las pruebas preliminares de desinfección de hojas se cosecharon hojas jóvenes, las cuales fueron divididas en tres secciones:

a.- Sección basal: Corresponde a la sección donde las hojas aún están envueltas, por lo cual presentan menos exposición a condiciones ambientales de contaminación. En esta sección, se encuentran las células más jóvenes.

b.- Sección intermedia: Corresponde a la sección de lámina foliar recién abierta, que tienen tejido joven y una exposición media a condiciones ambientales sin controlar.

c.- Sección apical: Corresponde a la sección de la hoja más expuesta y con células maduras, las cuales tienen mayor capacidad de resistir a un procedimiento de desinfección más prolongado y con mayores concentraciones de solución desinfectante o mayores tiempos de exposición.

### 2.3.1.1 Medio de cultivo

Para la siembra de los explantes foliares se utilizó el medio de cultivo de Heinz and Mee (1969) (cuadro1) utilizado para la diferenciación de tejidos y suplementado con las hormonas de Irvine y Benda (1985), Kinetina y ANA, a razón de 2.0 y 5.0 mg/L respectivamente. Al utilizar explantes foliares, se pretende una regeneración organogénica rápida, es por esto que utilizamos la combinación de Kinetina y la auxina ANA, las cuales son utilizadas para la inducción organogénica (George 1996). Además se utilizó como antioxidante ácido cítrico y ácido ascórbico.

Se utilizaron tubos de ensayo de 25 × 150 mm, en los cuales se dispensó 10 ml de solución nutritiva para cada uno, utilizando un medio semi-sólido, con una inclinación de 45° para aumentar el área de siembra.

Luego de ser dispensado el medio de cultivo en los tubos de ensayos, éstos fueron tapados y sometidos al procedimiento de esterilización, autoclavandolos a una temperatura de 121°C, con una presión de 15 psi durante 25 minutos. Los instrumentos utilizados para la siembra, tales como pinzas, bisturíes y platos petri fueron sometidos al mismo procedimiento de esterilización. El mismo procedimiento de esterilización se realizo para el establecimiento *in vitro* a partir de yemas axilares y en las pruebas principales de establecimiento.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo de Heinz and Mee (1969), utilizando en las pruebas preliminares de desinfección de explantes foliares de caña de azúcar, Zamorano, Honduras, 2006.

Componente	Cantidad
Macroelementos MS	Completas
Microelementos MS	Completas
Hierro	Completas
Sacarosa (g/L)	20.0
Mioinositol (mg/L)	100.0
Ácido nicotínico (mg/L)	0.5
Glicina (mg/L)	2.0
Tiamina (mg/L)	1.0
Piridoxina (mg/L)	0.5
Agua de coco (ml/L)	10.0
Ácido cítrico (mg/L)	150.0
Ácido ascórbico (mg/L)	100.0
pH	5.8

Fuente: George 1996.

### 2.3.1.2 Procedimiento de desinfección para explantes foliares

El procedimiento de desinfección realizado fue recomendado por ensayos realizados en el LCTM de Zamorano (Martínez Vega 2005).

Resultados obtenidos en estos ensayos utilizando explantes foliares, al utilizar una concentración de 5% de hipoclorito de sodio durante 25 minutos, se obtuvo un nivel de contaminación de 60%, que es aún muy elevado. En estos mismos ensayos realizados por Martínez (2005) al utilizar niveles de 10% de hipoclorito de sodio, se observaron niveles de necrosis severa en el material vegetal. Basándonos en esta información, para este estudio se evaluó el efecto de dos dosis de hipoclorito de sodio: 5 y 7%.

El procedimiento de desinfección utilizado se detalla a continuación:

- a) Las láminas foliares fueron segmentadas según la sección foliar correspondiente (apical, intermedio, basal), con un largo aproximado de 10 cm cada uno para someterlas al procedimiento de desinfección.
- b) Luego fueron lavadas dentro de un beaker con una solución de agua potable y detergente comercial, durante 20 minutos bajo el flujo constante del chorro de agua de la llave.
- c) A continuación se sumergieron durante 30 minutos dentro de un beaker, con agitación constante y conteniendo una solución fungicida – bactericida de Benlate y Agrimisín, a una concentración de 2 g/L de cada producto y 2 gotas de Tween 80 por cada 100 cc de solución.
- d) Seguidamente los explantes fueron expuestos a un enjuague con alcohol al 70% durante 20 segundos.
- e) Inmediatamente se realizó el procedimiento de desinfección correspondiente a cada uno de los dos tratamientos.

Cada tratamiento consistió en la inmersión de las hojas en un beaker con hipoclorito de sodio, uno al 5% y otro al 7% de concentración, con agitación constante, durante 25 minutos.

- f) Al terminar el paso anterior, las hojas fueron llevadas a la cámara de flujo laminar, donde se realizaron tres enjuagues, de 2 minutos cada uno, con agua destilada estéril, para remover los residuos de la solución desinfectante utilizada.

### **2.3.1.3 Siembra de explantes foliares**

La siembra de explantes foliares se realizó en cámara de flujo laminar, donde se trabajó en platos petri, manteniendo los explantes sumergidos en una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico a razón de 150 y 100 mg/L respectivamente, donde se segmentaron a un tamaño de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, colocándolo en el medio de cultivo en forma polar.

### **2.3.2 Pruebas preliminares utilizando yemas axilares**

Para las pruebas preliminares de desinfección utilizando yemas axilares, se cosecharon cañas que tenían ocho meses de edad, con ocho a diez yemas aproximadamente cada una. Estas fueron transportadas al laboratorio, donde fueron lavadas y segmentadas en trozos de 30 cm para ser sometidas al procedimiento de desinfección que se describe en 2.3.2.2.

#### **2.3.2.1 Medio de cultivo**

Para la siembra de yemas axilares, se utilizó un medio basal MS modificado, sin la adición de hormonas, recomendado en estudios previos realizados en el LCTM de Zamorano (Peña Paniagua 1997) (Cuadro 2). Para la solidificación del medio de cultivo se utilizaron 2 g/L de gelrita.

La siembra de yemas axilares en las pruebas preliminares se realizó en tubos de ensayo de 25 × 150 mm, donde cada uno correspondía a una unidad experimental. En cada tubo de ensayo se dispensaron 10 ml de solución nutritiva, y luego fueron sometidos al procedimiento de esterilización descrito en 2.3.1.1.

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo MS modificado, que se utilizó en las pruebas preliminares de desinfección de yemas axilares de caña de azúcar, Zamorano, Honduras, 2006.

Componentes	Cantidad (mg/L)
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0.830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	22.300
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8.600
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.250
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Fe Na EDTA</b>	37.300
<b>Componentes orgánicos</b>	
Mioinositol	100
Tiamina	1
Cisteína	50
Ácido cítrico	100
Agua de coco (ml/L)	10
Caseína hidrolizada	100
Sacarosa	30,000
pH	5.7

Fuente: Peña, 1997.

### 2.3.2.2 Procedimiento de desinfección para yemas axilares

El procedimiento de desinfección utilizado para yemas axilares ha sido recomendado por ensayos previos realizados en el LCTM de Zamorano (Martínez 2005). Los resultados del procedimiento de desinfección obtenidos para una variedad pueden diferir significativamente al ser evaluados en otra, es por esto la necesidad de medir su efectividad en estas nuevas cuatro variedades.

El proceso de desinfección utilizado para yemas axilares se detalla a continuación:

- a) Luego de remover las hojas, las cañas fueron lavadas para retirar residuos de tierra o agentes externos sobre la superficie de esta.
- b) Seguidamente las cañas fueron cortadas en trozos de aproximadamente 30 cm y se dejaron durante 24 horas en una solución funguicida-bactericida conteniendo Agrimicin y Benlate, a razón de 2 g/L de cada producto.
- c) Al remover las cañas de la solución desinfectante, éstas fueron lavadas y cepilladas para retirar todo tipo de residuos.
- d) Con la ayuda de un bisturí se disectaron las yemas axilares, e inmediatamente seguido fueron sumergidas en una solución de ácido cítrico (100 mg/L) y ácido ascórbico (150 mg/L), para evitar la oxidación de las yemas.
- e) Seguidamente las yemas fueron sometidas a un tratamiento térmico, para lo cual fueron colocadas en un biker con agua destilada y éste inmerso en un baño de María a 50° C durante una hora.
- f) Después del tratamiento térmico las yemas fueron sumergidas nuevamente en una solución fungicida de Agrimicín (2 g/L) y Benlate (2,5 g/L), durante una hora con agitación constante.
- g) Luego los explantes fueron sumergidos en una solución de alcohol al 70% durante 20 segundos.
- h) A continuación fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante una hora.
- i) Al terminar el tratamiento anterior, las yemas fueron transportadas a la cámara de flujo laminar, donde se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para remover los residuos de la solución desinfectante.
- j) Terminados los enjuagues, las yemas se mantuvieron en una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico (150 y 100 mg/L respectivamente), para evitar su oxidación.

### **2.3.2.3 Siembra de yemas axilares**

La siembra de yemas axilares se realizó en cámara de flujo laminar, donde se trabajó en platos petri, manteniendo los explantes sumergidos en una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico a razón de 150 y 100 mg/L respectivamente, donde se quitaron dos brácteas a cada yema y fueron puestas en el medio de cultivo.

## **2.4 PRUEBAS DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CAÑA DE AZÚCAR, DE LAS VARIEDADES RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797**

### **2.4.1 Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de explantes foliares**

#### **2.4.1.1 Explante utilizado**

Para la siembra de caña de azúcar a partir de explantes foliares, se utilizó la sección foliar apical, que es donde se observaron los menores índices de contaminación en los ensayos preliminares.

#### **2.4.1.2 Procedimiento de desinfección**

El procedimiento de desinfección utilizado para explantes foliares, es el que utiliza una concentración del 7% de hipoclorito de sodio durante 25 minutos, según lo establecido por los ensayos preliminares de desinfección.

#### **2.4.1.3 Medio de cultivo**

En las pruebas preliminares de establecimiento a través de explantes foliares se utilizó el medio de Heinz and Mee (1969), suplementado con las hormonas de Irving and Benda (1985), pero no se observó ningún tipo de respuesta en la inducción organogénica esperada.

Por esta razón se optó por utilizar el mismo medio básico de Heinz and Mee (1969) (Cuadro 1), sin la adición de las hormonas de Irving and Benda (1985) y que es utilizado para inducción callogénica cuando se utiliza la combinación de Kinetina con la auxina AIA (George 1996).

También se utilizó el medio de Payan y Tarcón (1977) recomendado para la formación de tejido callogénico a partir de explantes foliares (Marcano 2002) (Cuadro 3).

Además para evitar la alta oxidación presentada en las pruebas preliminares de establecimiento se incluyeron dos concentraciones de cisteína: 50 y 100 mg/L.

Cuadro 3. Composición del medio de cultivo de Payan y Tarcón 1977, utilizado para la inducción calogénica en explantes foliares de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, Zamorano, Honduras, 2006.

Componentes	Cantidad (mg/L)
Macroelementos (MS)	100%
Microelementos (MS)	100%
Fe Na EDTA	100%
Sacarosa	20,000
Mioinositol	100
Tiamina	1
2,4-D	3
Agua de coco (ml/L)	180
pH	5.8

Fuente: CIAT 1991.

## 2.4.2 Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de yemas axilares

### 2.4.2.1 Procedimiento de desinfección

En los resultados obtenidos en los ensayos preliminares se observó una mínima contaminación, pero niveles altos de necrosis en el material vegetal, razón por la cual se mantuvieron las concentraciones de la solución pero se disminuyeron los tiempos de exposición de los explantes. La exposición a baño María se disminuyó de una hora a 40 minutos; el tiempo de exposición a la solución fungicida de Agrimicín y Benlate igualmente se disminuyó de una hora a 30 minutos y el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio también se redujo de una hora a 40 minutos.

### 2.4.2.2 Medio de cultivo

El medio utilizado fue el mismo que en los ensayos preliminares de desinfección (Cuadro 2). En dichos ensayos al utilizar el medio en forma semi-sólida se obtuvieron altos niveles de oxidación, razón por la cual se optó por cambiar el medio a forma líquida utilizando puentes de papel filtro para evitar la acumulación de fenoles en el medio.

Para la siembra se utilizaron tubos de ensayo de 25 × 150 mm, los cuales cada uno correspondió a una unidad experimental, evaluándolos individualmente. En cada tubo de ensayo se dispensaron 10 ml de solución nutritiva.

## 2.5 SIEMBRA

### 2.5.1 Explantes foliares

Durante el tiempo de preparación de los explantes, las láminas se mantuvieron en una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico a razón de 150 y 100 mg/L, respectivamente. Con la ayuda de bisturí y pinzas se cortaron explantes de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, eliminando los bordes, y procurando dejar una porción de la nervadura central de la hoja en cada explante. Estos explantes fueron puestos en tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo semi - sólido correspondiente al tratamiento.

### 2.5.2 Yemas axilares

Para la siembra de yemas axilares, éstas se mantuvieron en todo momento inmersas en una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico (150 y 100 mg/L respectivamente).

En platos petri, con la ayuda de bisturí y pinzas, y trabajando bajo la mira del estereoscopio, se retiraron dos o tres brácteas de las yemas con el objetivo de eliminar algún tipo de contaminación remanente. Luego las yemas fueron sembradas en el medio de cultivo correspondiente a cada tratamiento, colocando una yema por contenedor, sobre el papel filtro suspendido sobre el medio de cultivo líquido.

## 2.6 VARIABLES A EVALUAR

La toma de datos se llevó a cabo durante las seis semanas que permanecieron los tratamientos en el cuarto de crecimiento. Se evaluaron criterios en la toma de datos tales como: oxidación, necrosis, contaminación y respuesta a la formación de tejido callogénico. Estas variables se evaluaron según una escala determinada para cada variante:

**Contaminación:** Se determinó la presencia o ausencia de contaminación, determinando a la vez el tipo de contaminante: hongo, bacteria o ambas.

**Necrosis:** Se determinó el nivel de necrosis en la hoja, categorizando los niveles encontrados de la siguiente manera:

- 0 = no presencia de necrosis
- 1 = Bajos niveles de necrosis (menos del 25% de la superficie del explante)
- 2 = necrosis media (25 - 50% de la superficie del explante)
- 3 = Altos niveles de necrosis (50 – 75% de la superficie del explante)
- 4 = Necrosis severa (más del 75% del explante necrosado)

**Oxidación:** Los niveles de oxidación igualmente fueron cuantificados en una escala de 0 a 3, la cual se detalla a continuación:

- 0 = no presencia de oxidación
- 1 = oxidación baja
- 2 = oxidación media
- 3 = oxidación severa

Se evaluó la presencia o ausencia de tejido callogénico.

Todas estas variables se midieron de manera subjetiva, ya que se realiza mediante la observación, y después de un entrenamiento. Siempre fue la misma persona quien realizó las evaluaciones.

## **2.7 ANÁLISIS DE LAS VARIABLES**

Las variables evaluadas fueron analizadas de manera cualitativa, determinando a través de porcentajes los niveles correspondientes a cada una.

Para el caso de la contaminación, se determinó el número de unidades experimentales sobrevivientes, expresándolo en forma de porcentaje del total. Para la oxidación, se tomó como parámetro el porcentaje de unidades experimentales que presentaron un nivel de oxidación severa, siendo ésta la que mayormente impide la regeneración del explante.

Para el caso de la necrosis, se determinó que los niveles alto y severo de necrosis son los que mayormente impiden la regeneración del tejido, por lo cual se tomaron estos niveles y fueron sumados, expresándolos en porcentaje sobre el total de unidades experimentales existentes. La formación de tejido callogénico se expresó en porcentaje de unidades experimentales que tuvieron una respuesta positiva a la formación de callo.

### **2.7.1 Tratamientos para explantes foliares**

Para las pruebas principales de establecimiento a partir de explantes foliares se midieron dos medios de cultivo: Heinz and Mee (1969) y Payán y Tarcón (1977), con dos concentraciones de cisteína (50 y 100 mg/L) para cada una de las cuatro variedades, totalizando 16 tratamientos con tres repeticiones de 15 unidades experimentales (tubos) cada una, para un total de 720 unidades experimentales.

### **2.7.2 Tratamientos para yemas axilares**

Para las pruebas de establecimiento a partir de yemas axilares, se midieron dos concentraciones de la hormona BAP (2 y 4 mg/L) para cada una de las cuatro variedades analizadas, totalizando ocho tratamientos. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento, con 15 unidades experimentales por repetición, para una total de 360 unidades experimentales.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 PRUEBAS DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CAÑA DE AZÚCAR, DE LAS VARIEDADES RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797**

En las pruebas principales de establecimiento a partir de explantes foliares y yemas axilares, para las cuatro variedades analizadas, se evaluaron las variables de contaminación, oxidación, necrosis y respuesta a la formación de tejido callogénico, las cuales fueron evaluadas durante las seis semanas que duró el experimento.

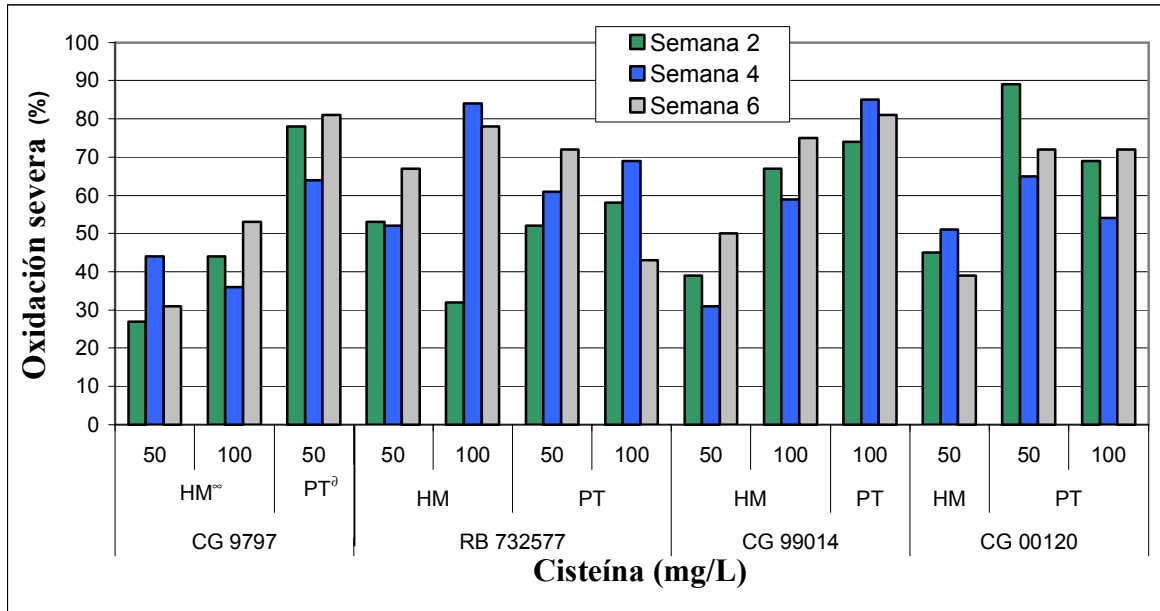
##### **3.1.1 Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de explantes foliares**

###### **3.1.1.1 Oxidación**

Para el establecimiento *in vitro* a partir de explantes foliares, a la segunda semana de evaluación, todos los tratamientos presentaron niveles de oxidación severa superiores al 30%, superando incluso el 70% en los tratamientos donde se utilizó el medio de Payan y Tarcón (1977). Por esta razón se transfirieron de medio de cultivo cada dos semanas, a manera de mitigar los efectos de la oxidación en los explantes.

El medio de Heinz and Mee (1969) tuvo una tendencia a presentar menores niveles de oxidación severa en todas las variedades analizadas. A la vez, el nivel de 50 mg/L de cisteína presentó niveles inferiores de oxidación severa.

Los menores niveles de oxidación severa se presentaron con el medio Heinz and Mee (1969) con la adición de 50 mg/L de cisteína, presentando el mismo patrón de comportamiento en todas las variedades. (Figura 1).



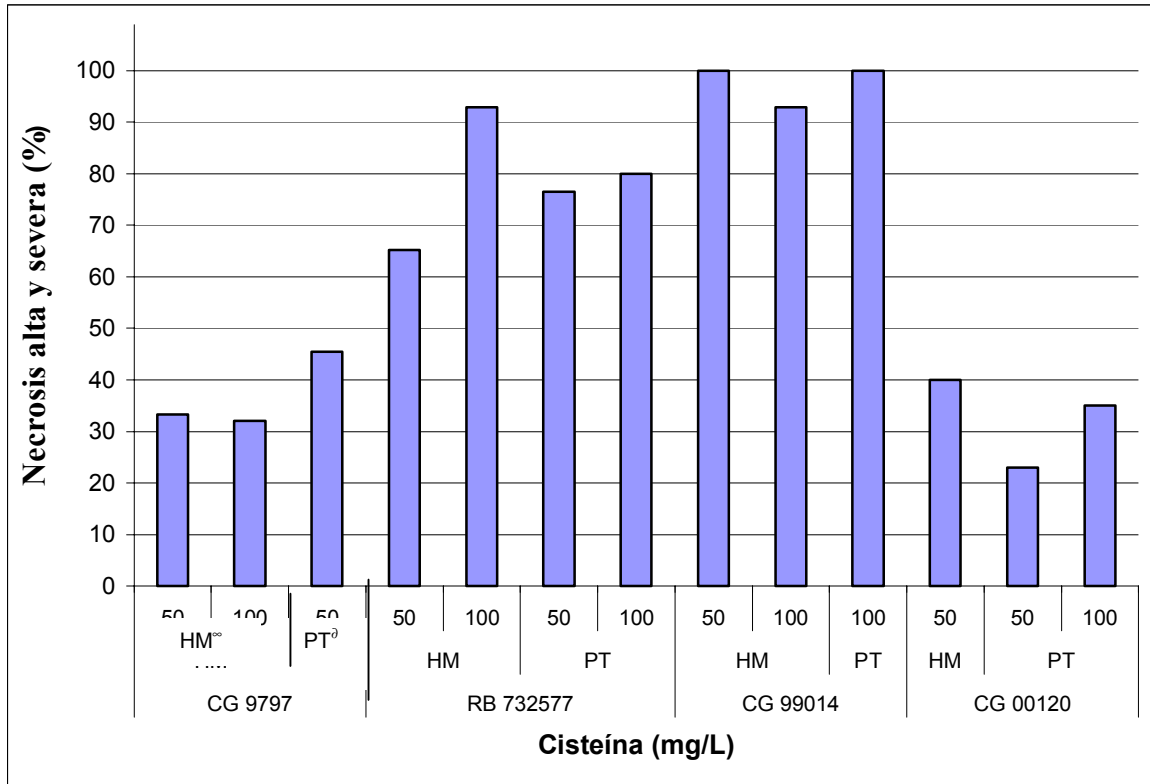
<sup>°</sup>HM: Heinz and Mee (1969); <sup>°</sup>PT: Payán y Tarcón (1977)

Figura 1. Niveles de oxidación severa a las semanas dos, cuatro y seis de incubación durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2006.

### 3.1.1.2 Necrosis

En el establecimiento *in vitro* a partir de explantes foliares se consideraron los niveles altos y severos de necrosis, siendo estos los que causan el mayor daño al tejido, impidiendo cualquier tipo de regeneración por encontrarse en riesgo un área foliar necrótica superior al 50%.

Todos los tratamientos presentaron niveles elevados de necrosis alta y severa. Las variedades CG 9797 y CG 00120 presentaron niveles de necrosis alta y severa menores al 40%. La variedad CG 99014 presentó niveles elevados de necrosis alta y severa, superando el 93% en todos sus tratamientos. Así mismo la variedad RB 732577 presentó un nivel de necrosis alta y severa superior al 75%. Además, se presenta una tendencia a una menor incidencia de necrosis al utilizar 50 mg/L de cisteína en ambos medios de cultivo (Figura 2).



<sup>1</sup>HM: Heinz and Mee (1969); <sup>2</sup>PT: Payán y Tarcón (1977).

Figura 2. Niveles de necrosis alta y severa a las seis semanas de incubación durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2006.

### 3.1.1.3 Contaminación

Para el establecimiento *in vitro* a partir de explantes foliares en las cuatro variedades analizadas, los niveles de sobrevivencia observados fueron inferiores al 50% en todos los tratamientos. Hubo tratamientos en los que se observaron niveles de sobrevivencia de 0%, entre ellos están las variedades CG 9797, CG 99014 y CG 00120 en los medios de Payan y Tarcón (1977) para la primera y segunda variedad y el medio Heinz and Mee (1969) para la tercera.

El mayor porcentaje de contaminación fue causado por bacterias, seguido por la incidencia de hongos-bacteria. La contaminación causada por hongos fue la que tuvo la menor incidencia.

Cuadro 4. Niveles de contaminación y sobrevivencia a las seis semanas de incubación durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de explantes foliares, Zamorano, Honduras, 2006.

Variedad	Medio de cultivo	Cisteína mg/L	Contaminación %				Sobrevivencia
			Hongo	Bacteria	Hongo-Bacteria	Total	
CG 9797	HM	50	13	20	27	60	40
		100	18	31	24	73	27
	PT	50	18	33	24	76	24
		100	29	44	27	100	0
RB 732577	HM	50	15	18	16	50	50
		100	13	20	36	69	31
	PT	50	11	24	27	62	38
		100	11	20	36	67	33
CG 99014	HM	50	22	24	33	80	20
		100	18	38	13	69	31
	PT	50	24	44	31	100	0
		100	20	40	27	87	13
CG 00120	HM	50	2	58	18	78	22
		100	18	69	13	100	0
	PT	50	13	71	7	91	9
		100	9	73	7	89	11

HM: Heinz and Mee (1969); PT: Payan y Tarcón (1977).

### 3.1.2 Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades RB 732577, CG 99014, CG 00126 y CG 9797, a partir de yemas axilares

#### 3.1.2.1 Formación de tejido callogénico

En el establecimiento *in vitro* de las cuatro variedades, se evaluó la respuesta positiva a la formación de tejido callogénico, observándose altos niveles de regeneración callogénica. Para los tratamientos adicionados con 2 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP, se observó una tendencia a una mejor respuesta a la formación de tejido callogénico (Cuadro 7).

Las variedades RB 732577 y CG 99014 con la adición de 2 mg/L de BAP presentaron los mayores niveles de respuesta a la formación de tejido callogénico (superior al 92%). La variedad CG 9797 con la adición de 4 mg/L de BAP tubo la menor respuesta a la formación de tejido callogénico llegando a un 60%. La variedad CG 00 120 tubo una respuesta positiva de un 80%.

Cuadro 5. Porcentaje de tejido callogénico a las seis semanas de incubación durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006.

Variedad	Hormonas mg/L		Formación de tejido callogénico %
	2,4-D	BAP	
RB 732577	2	2	94
	2	4	75
CG 00120	2	2	80
	2	4	
CG 99014	2	2	92
	2	4	80
CG 9797	2	2	
	2	4	60

### 3.1.2.2 Oxidación

Para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar a partir de yemas axilares, los niveles de oxidación observados a la semana dos, fueron elevados, por lo cual se realizaron sub-cultivos (traspasos de medio) cada dos semanas, hasta la semana seis.

Para la evaluación de los niveles de necrosis, se consideró el nivel severo, siendo superior al 50% en todos los tratamientos. La variedad RB 732577 con la adición de 4 mg/L de BAP, presentó los menores niveles de oxidación severa (51%), mientras que la variedad CG 00120 con la adición de 2 mg/L de BAP presentó los mayores niveles de oxidación severa (89%) (Figura 3).

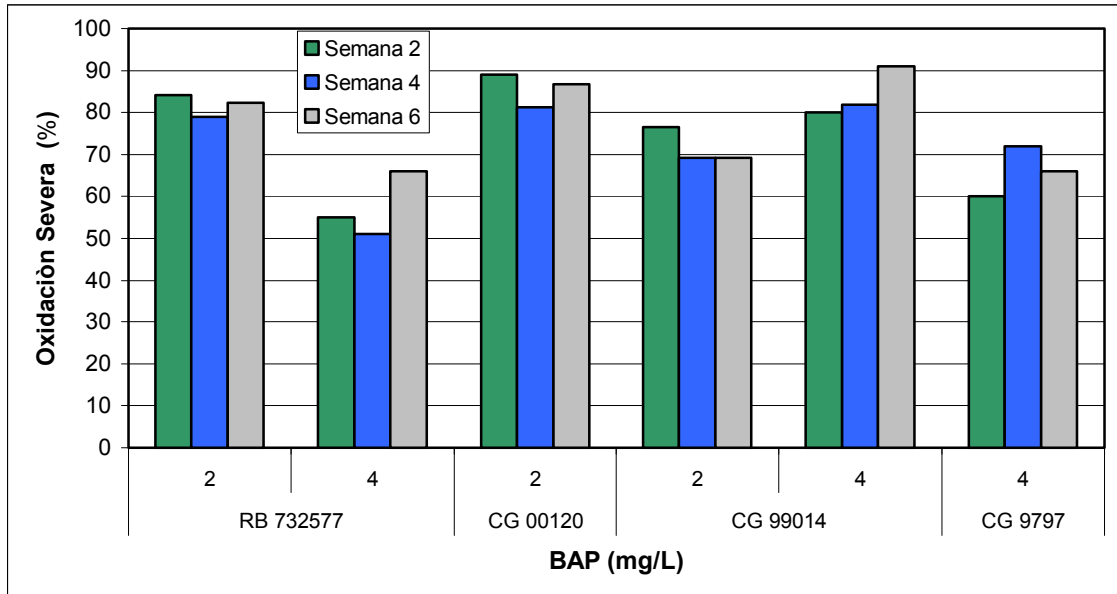


Figura 3. Niveles de oxidación severa a las semanas dos, cuatro y seis de incubación durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006.

### 3.1.2.3 Necrosis

En el establecimiento *in vitro* a partir de yemas axilares, se evaluaron los niveles de necrosis altos y severos, siendo estos los que presentan el mayor impedimento para la regeneración de tejido, ya que se encuentra necrosada más del 50% del área del explante.

Los niveles de necrosis altos y severos observados fueron elevados para todos los tratamientos, siendo la variedad RB 732577 con la adición de 2 mg/L de BAP la que presentó el menor nivel de necrosis (41%) y el mayor nivel de necrosis observado fue en la misma variedad con la adición de 4mg/L de BAP (87%) (Figura 3).

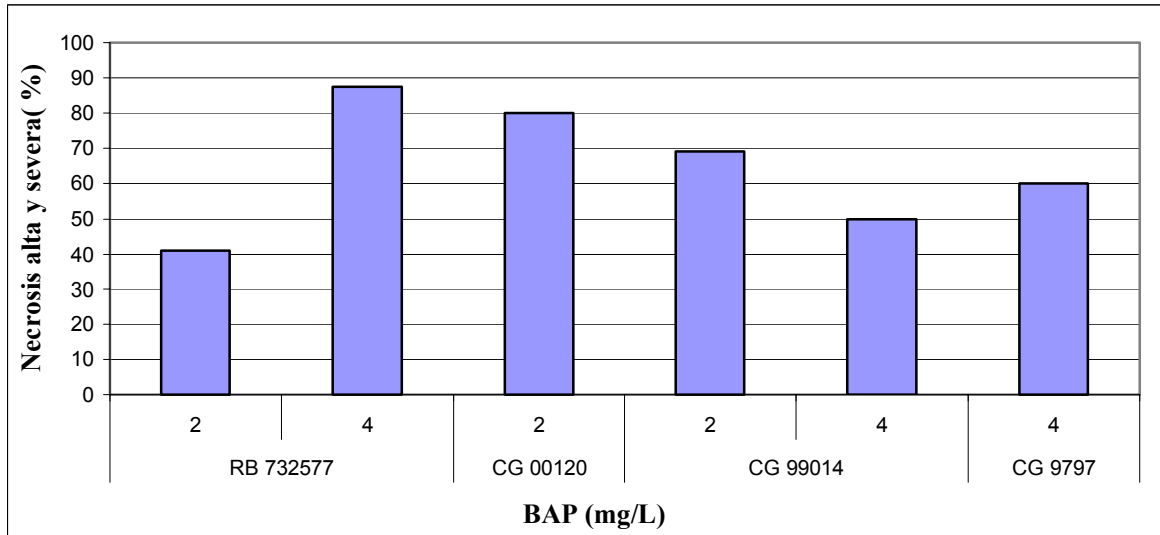


Figura 4. Niveles de necrosis alto y severo a las seis semanas de incubación durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006.

### 3.1.2.4 Contaminación

En el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, para las cuatro variedades, a partir de yemas axilares, los niveles de contaminación observados fueron bastante elevados presentando 0% de sobrevivencia en los tratamientos de la variedad CG 00120 suplementada con 4 mg/L de BAP y la variedad CG 9797 suplementado con 2 mg/L de BAP. En los tratamientos restantes los niveles de sobrevivencia fueron inferior al 37% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Niveles de contaminación a las seis semanas de incubación durante el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedades CG 9797, RB 732577, CG 99014 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2006.

Variedad	Hormonas mg/L		Contaminación %				Sobrevivencia
	2,4-D	BAP	Hongo	Bacteria	Hongo-Bacteria	Total	
RB 732577	2	2	0	47	18	64	36
	2	4	7	56	33	87	13
CG 00120	2	2	4	27	38	69	31
	2	4	2	56	47	100	0
CG 99014	2	2	7	51	18	76	24
	2	4	13	47	16	76	24
CG 9797	2	2	0	51	49	100	0
	2	4	42	18	29	87	13

## 4. CONCLUSIONES

Según los ensayos preliminares para explantes foliares, durante el procedimiento de desinfección se obtuvo menor contaminación en todos los genotipos utilizando 7% de hipoclorito de sodio durante 25 minutos.

Según los ensayos preliminares, la sección foliar apical presentó una mejor respuesta en cuanto a menor necrosis observada y mayor sobrevivencia.

En explantes foliares, no hubo respuesta a la formación callogénica con las soluciones nutritivas evaluadas.

En los ensayos realizados con yemas axilares, existe tendencia a una mayor regeneración callogénica al utilizar 2 mg/L de BAP con 2 mg/L de 2,4-D.

Tanto con explantes foliares como con yemas axilares, se presentaron niveles de oxidación elevados.

Tanto para explantes foliares como yemas axilares, los niveles de necrosis fueron elevados.

## 5. RECOMENDACIONES

Para evitar la contaminación al trabajar con material traído directamente del campo, es necesario realizar una siembra de esquejes en invernadero y así obtener material libre de patógenos para el uso de secciones foliares.

Al momento de realizar la siembra de las yemas axilares, se debe retirar un mayor número de brácteas de la yema, y así reducir el riesgo de contaminación exógena producida por el material contaminado.

Evaluar el efecto de la luz sobre la reducción de oxidación del material, para lo cual, al momento de realizar el establecimiento de los tratamientos en el cuarto de crecimiento, se debe dejar en la oscuridad los explantes durante un tiempo que igualmente requiere ser evaluado, que puede estar en un rango de dos días hasta dos semanas.

Al obtener vitroplantas en el laboratorio de la variedad deseada, realizar ensayos de propagación *in vitro* con este material utilizando vitroplantas, el cual está libre de patógenos, y así disminuir la contaminación causada por material introducido del campo o del invernadero.

Establecer períodos de cuarentena y planes de manejo fitosanitario en los lotes de donde se extraerá el material a utilizar.

## 6. LITERATURA CITADA

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). 1991. *Cutivo de Tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Roca, W; Mroginski, L. Eds. Cali, Colombia. Editorial XYZ. 970 p.

George, E. 1996. *Plant Propagation by Tissue Culture - Part 2 - In Practice*. England.

La Prensa, 2006. Azucareros; DEI Rechaza exoneraciones (Diario)(en línea). Honduras. Consultado 12 agosto 2006. Disponible en:  
[http://www.laprensahn.com/economia\\_nota.php?id04962=10606&t=1148018400](http://www.laprensahn.com/economia_nota.php?id04962=10606&t=1148018400)

Marcano, A; 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 10 sep. Disponible en:  
[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf).

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. Tesis Lic. Ingeniero Agrónomo. Honduras. Zamorano. 52 p.

Peña Paniagua, M. 1997. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar. Tesis Ingeniero Agrónomo. Honduras. Zamorano. 36 p.

Pérez, J. 1993. Cultivo de tejido en la caña de azúcar: Micropropagación *In Vitro*. (en línea). Cali. CIAT. Consultado 12 junio 2006. Disponible en:  
[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf)