

**Efecto de tratamientos antioxidantes en el
establecimiento *in vitro* de dos genotipos de
caña de azúcar del Ingenio La Grecia,
Honduras**

Julia María Gómez Pineda

Honduras
Diciembre, 2007

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Efecto de tratamientos antioxidantes en el
establecimiento *in vitro* de dos genotipos de
caña de azúcar del Ingenio La Grecia,
Honduras**

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

Presentado por:
Julia María Gómez Pineda

Honduras
Diciembre, 2007

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

Julia María Gómez Pineda

Honduras
Diciembre, 2007

Efecto de tratamientos antioxidantes en el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar del Ingenio La Grecia, Honduras

Presentado por:

Julia María Gómez Pineda

Aprobado:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc
Asesora principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Director de la Carrera de Ciencia
y Producción Agropecuaria

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

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

DEDICATORIA

A Dios por ser siempre mi guía.

A mis padres, Justina Pineda y Adrián Gómez, por su apoyo y amor incondicional

A Clara y Adrián por ser los mejores hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme las fuerzas necesarias en los momentos difíciles y ser mi guía siempre

A mi padres Adrián Gómez y Justina Pineda por ser mi ejemplo, por brindarme su comprensión, confianza, apoyo y amor. Gracias por todo.

A mis hermanos Adrián y Clara por apoyarme siempre a pesar de la distancia.

A la Ing. Dinie Espinal de Rueda, por su gran ayuda y colaboración en la realización de este trabajo. Por brindarme su amistad, paciencia, dedicación y comprensión en todo momento.

Al Dr. Alfredo Rueda y Dr. Isidro Matamoros, por su apoyo en el transcurso de este trabajo.

Al Ingenio Azucarero La Grecia por el apoyo para la realización de este trabajo.

A Daniela Córdova, Claudia Vallejo, Fabián Díaz, gracias por todo el apoyo en el laboratorio.

A Erika Ramos y Zoila Sandoval, por su colaboración en la realización de la tesis y por todas sus enseñanzas en el laboratorio.

A la familia Cabanilla Burbano por acogerme en su hogar, en especial a Erika e Ingrid por brindarme su amistad, consejos y apoyo en Ecuador.

A Vivian Salas, por ser mi soporte en todo momento, por darme su amistad y consejos en Zamorano. Muchas Gracias.

A mis compañeras de cuarto, Gabriela Montero y María Belén Martínez por su cariño y comprensión en todo este tiempo viviendo juntas.

A Paola Mancía, Hilda Peña, Loren Rivera, Nancy Hernández y Clara Gómez, por escucharme siempre y darme su amistad en Zamorano.

A Juan Pablo Chicaíza, José Rafael Gómez, Mitchell Grijalva y Jorge Rojas por todos los buenos momentos.

RESUMEN

Gómez, J. 2007. Efecto de tratamientos antioxidantes para el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar del Ingenio La Grecia, Honduras. Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras. 14 p.

La caña de azúcar es uno de los cultivos que presenta problemas de oxidación al propagarse *in vitro*. El objetivo de este estudio fue evaluar tratamientos antioxidantes para el establecimiento de las variedades CG 9797 y CG 00120 a partir de yemas axilares. Los tratamientos antioxidantes utilizados fueron cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) a razón de 50 y 300 mg/L, que fueron mantenidos durante 0 y 10 días en obscuridad después de la siembra. El material vegetal se desinfectó con una solución de Agrymicin y Benlate durante 24 horas, luego se procedió a la siembra de las yemas axilares en las cámaras de flujo laminar. En las variedades, los tratamientos sembrados con CG 00120 tuvieron la mayor regeneración callogénica 60% ($P < 0.05$). Los tratamientos con cisteína presentaron menos oxidación (6%) comparado a aquellos conteniendo PVP con una oxidación del 30%. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) al someter el material a 0 y 10 días de obscuridad después de la siembra. La contaminación se dio al azar, siendo las bacterias las que más afectaron 10% ($P > 0.05$). En la interacción entre factores no se observaron diferencias en la regeneración callogénica, oxidación y contaminación. Se recomienda utilizar cisteína a 50 mg/L para contrarrestar los daños de oxidación y evaluar el vigor del genotipo CG 00120 a nivel de campo.

Palabras clave: Callogénesis, cisteína, obscuridad, polivinilpirrolidona

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autenticación	ii
Página de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen	vi
Contenido	vii
Índice de cuadros.....	viii
Índice de gráficos	ix
Índice de anexos	x
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
CONCLUSIONES.....	10
RECOMENDACIONES.....	11
LITERATURA CITADA.....	12
ANEXOS.....	13

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Niveles de contaminación a las nueve semanas del establecimiento <i>in vitro</i> de dos genotipos de caña de azúcar, CG 9797 y CG 00120, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2007	9

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
1. Efectos de dos antioxidantes (Cisteína y PVP) y 0 y 10 días de exposición a la obscuridad después de la siembra en porcentajes de formación de tejido callogénico en la novena semana durante del establecimiento <i>in vitro</i> de dos genotipos de caña de azúcar, CG 9797 y CG 00120. Zamorano, Honduras, 2007.....	5
2. Respuesta en la formación de tejido callogénico a la semana nueve durante el establecimiento <i>in vitro</i> de dos genotipos de caña de azúcar, CG 00120 y CG 9797, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2007.....	6
3. Efectos de dos antioxidantes (Cisteína y PVP) y 0 y 10 días de exposición a la obscuridad después de la siembra en porcentajes de oxidación en la novena semana durante del establecimiento <i>in vitro</i> de dos genotipos de caña de azúcar, CG 9797 y CG 00120, Zamorano, Honduras, 2007	7
4. Respuesta en el porcentaje de oxidación de yemas axilares, a la semana nueve durante el establecimiento <i>in vitro</i> de dos genotipos de caña de azúcar, CG 00120 y CG 9797, Zamorano, Honduras, 2007	8

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Composición del medio de cultivo MS utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1997.	12
2. Proceso de desinfección de dos genotipos de caña de azúcar (CG 9797 y CG 00120) a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2007	13

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*. Por años la caña se propaga de manera vegetativa por medio de estacas o esquejes (Sánchez 1999).

A nivel mundial la producción azucarera para 2006-2007 se estima en 155.5 millones de toneladas métricas. En América Latina y el Caribe se produce el 33.1% de la producción mundial (FAO 2006).

El incremento de material vegetativo por el método de siembra de esquejes en campo, como semilla, permite una tasa de multiplicación de 1 a 10 en siete meses, determinando un coeficiente de multiplicación bajo. El uso de cultivo de tejidos permite tasas de multiplicación mayores, el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de Caña de Azúcar (CENGICANA) ha tenido resultados hasta 14,000 plantas libres de enfermedades sistémicas en siete meses¹.

En el 2006 se realizó un estudio conjunto entre el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *in vitro* de Zamorano y con el Ingenio Azucarero La Grecia de Choluteca, Honduras, para propagar las nuevas variedades de caña RB 732577, CG 99014, CG 00120 y CG 9797. En el establecimiento de las variedades se presentaron dificultades debido a la contaminación y una oxidación severa de los explantes, que causó una baja regeneración del material (Araya 2006).

La caña de azúcar es uno de los cultivos que presenta problemas de oxidación al propagarse *in vitro*. El porcentaje de oxidación depende de: la composición genética del material, la etapa fisiológica y del tipo de explante con que se trabaje (CIAT 1991). Al hacer heridas y cortes con tejidos, la respuesta natural metabólica de los tejidos es la liberación de los polifenoles presentes en los explantes al medio de cultivo. Una oxidación obscurece y deteriora el medio de cultivo y afecta la regeneración y sobrevivencia de los explantes (Zambrano *et al.* 1995).

Los antioxidantes, cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) son muy utilizados en la prevención de oxidación de explantes. La cisteína remueve cualquier formación de quinonas en el medio de cultivo, favoreciendo una baja oxidación de los explantes propagados. Al ser un aminoácido, la cisteína induce al desarrollo de los tejidos, ya que

¹ López, E.; Ovalle, W.; Orozco, H.; Quemé, J. 2003. Micropropagación de variedades promisorias de caña de azúcar. (correspondencia). Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de Caña de Azúcar (CENGICANA).

suple los requerimientos de nitrógeno del tejido. La poliamida PVP en concentraciones adecuadas logra tejidos libres de oxidación, incrementando dicha concentración, produce bajas regeneraciones en los explantes. La oxidación se da por un incremento de la biosíntesis de enzimas y la oxidación de fenoles involucradas en dicho proceso bajo condiciones de luz. Por tal razón, es conveniente mantener los explantes en la obscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja (Sánchez-Cuevas y Salaverría 2004).

Con este estudio se estableció un protocolo de establecimiento para reducir la oxidación en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar y a su vez mejorar la regeneración de tejidos. Se determinó un procedimiento de desinfección y evaluó tratamientos antioxidantes (dos antioxidantes y dos efectos de obscuridad) en dos genotipos de caña de azúcar (CG 00120 y CG 9797) para reducir la fenolización de los tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *In Vitro* (LCTRIV) de Zamorano, Honduras, durante los meses de mayo-octubre del 2007.

El material vegetal se obtuvo del Ingenio Azucarero La Grecia, ubicado en el departamento de Choluteca, Honduras. Se utilizó como explantes yemas axilares de caña de azúcar de dos variedades, CG 00120 y CG 9797. Las cañas se cosecharon con cinco meses de edad y 3-4 yemas axilares por caña.

El ingenio la Grecia se encargó de aplicar fertilizante nitrogenado a los 60-80 días y 20 días después; además de una aplicación foliar de 5-10-5 a los 120 días.

Para la siembra de las yemas axilares se utilizó un medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) modificado en forma líquida con puentes de papel filtro para evitar la acumulación de fenoles en el medio (Anexo 1). En este medio se adicionaron las hormonas benzilaminopurina (BAP) y 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) a concentraciones de 2 mg/L cada una (Araya 2006). En el medio de cultivo MS modificado se hicieron adiciones separadas de los antioxidantes cisteína y PVP a razón de 50 y 300 mg/L, respectivamente.

La siembra se realizó en tubos de ensayo de 25 × 150 mm, conteniendo puentes de papel filtro de 1 × 2 cm y dispensando 10 mL de solución nutritiva. Éstos fueron sometidos a un procedimiento de esterilización a una temperatura de 121°C, con una presión de 15 psi durante 30 minutos. Los instrumentos utilizados en la siembra (pinzas, bisturíes y platos petri) fueron sometidos al mismo procedimiento de esterilización.

El procedimiento de desinfección para yemas axilares de Araya (2006) fue el utilizado en este estudio, si bien se redujo el tiempo de exposición al tratamiento térmico de una hora a 40 minutos (Anexo 2).

La siembra se realizó en las cámaras de flujo laminar, donde se trabajó en platos petri para evitar el riesgo de oxidación. Los explantes se mantuvieron sumergidos en una solución antioxidante de ácido cítrico y ascórbico a razón de 100 y 150 mg/L respectivamente.

Se retiraron de 2-3 brácteas por yema con bisturíes, pinzas y estereoscopio, con el objetivo de eliminar cualquier tipo de contaminación remanente. Se sembró una yema por tubo de ensayo y sobre el papel filtro suspendido en el medio de cultivo líquido.

Para evaluar el efecto de la obscuridad, se realizaron dos ensayos en los que se evaluaron periodos de 0 y 10 días de obscuridad inmediatamente después de la siembra. Ambos ensayos estuvieron bajo condiciones de laboratorio, con temperatura de 25°C, con 16 horas luz. Se usaron lámparas fluorescentes Sylvania Daylight F96T12/D/EX² con una luminosidad de 1000-3000 lux. las gradillas que estaban en obscuridad, se cubrieron con papel aluminio por 10 días.

La toma de datos se llevó a cabo durante nueve semanas que permanecieron los tratamientos en el cuarto de crecimiento del LCTRIV. Las variables que se midieron durante este período fueron: la regeneración de tejido callogénico, la oxidación y la contaminación.

Después de nueve semanas de establecida las variedades de caña de azúcar, se midió la regeneración de tejido callogénico en categorías de 0-4: 0 = ausencia de regeneración, 1 = 1-25% de tejido callogénico cubriendo el explante inicial, 2 = 26-50% de callogénesis, 3 = 51 a 75% de tejido callogénico y 4 = una regeneración del 76-100%.

La oxidación se cuantificó de igual manera en categorías del 0-3: 0 = ausencia de oxidación, 1 = oxidación leve, 2 = oxidación intermedia y 3 = oxidación severa. La contaminación se determinó por la presencia o ausencia de agentes patógenos como bacterias u hongos.

La evaluación de estas variables se realizó de manera subjetiva. Después de un entrenamiento previo al experimento, la misma persona tomó datos durante las nueve semanas.

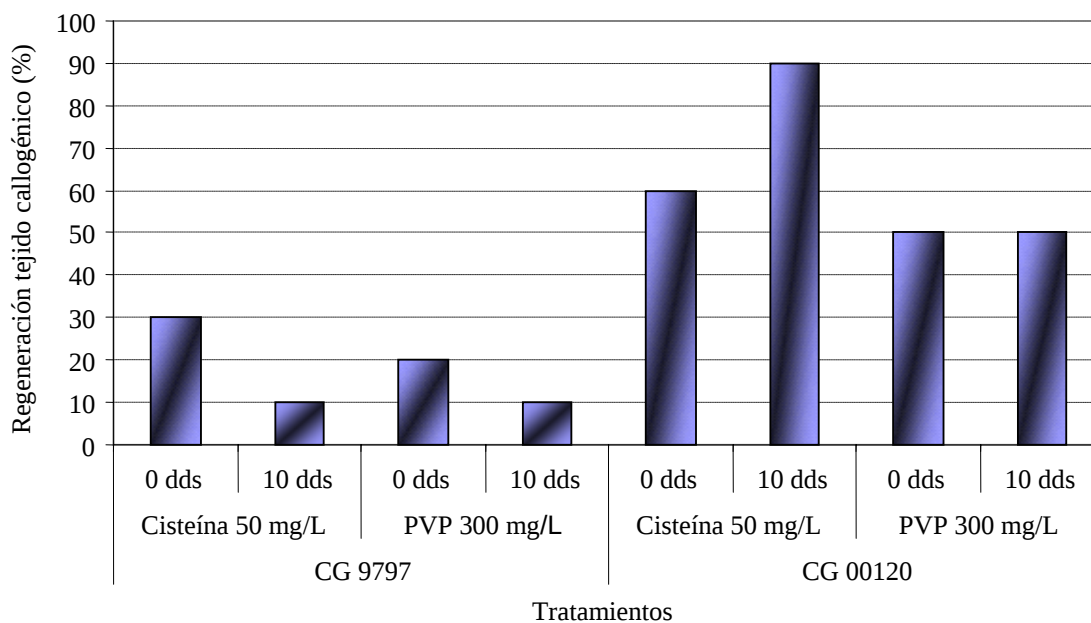
Se totalizaron ocho tratamientos con tres repeticiones cada uno; cada repetición con 20 unidades experimentales, para un total de 480 unidades experimentales. Se utilizó un diseño experimental utilizado fue un Diseño Completo al Azar (DCA), con un arreglo factorial de $2 \times 2 \times 2$, (dos variedades, dos antioxidantes y dos efectos de obscuridad). Para el análisis de las variables: regeneración de tejido callogénico, oxidación y contaminación, se aplicó el Modelo Lineal General (GLM) con una separación de medias con la prueba Student-Newman-Keuls (SNK). El paquete estadístico utilizado fue el Statistic Analysis System (SAS[®] 2005) con un nivel de significancia de 0.05.

² Osram Sylvania ©. Danvers, Massachusetts, U.S.A.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron las variables de regeneración de tejido callogénico, oxidación y contaminación durante las nueve semanas que duró el estudio.

Regeneración de tejido callogénico. En cada variedad no se encontró diferencia significativa entre antioxidantes ($P>0.05$) (Gráfica 1).



dds = días después de la siembra

PVP = polivinilpirrolidona

Gráfico 1. Efecto de dos antioxidantes (Cisteína y PVP) y 0 y 10 días de exposición a la obscuridad después de la siembra en los porcentajes de formación de tejido callogénico, en la novena semana durante del establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar, CG 9797 y CG 00120, Zamorano, Honduras, 2007.

La polivinilpirrolidona a dosis muy altas puede inhibir la regeneración de tejidos en explantes propagados *in vitro* (Sánchez-Cuevas y Salaverría 2004). Por tal razón, se infiere que la concentración utilizada de PVP para el establecimiento *in vitro* de los dos genotipos analizados afectó la callogénesis en los tratamientos.

La respuesta de los explantes a la obscuridad con respecto a la callogénesis, no fue la esperada tomando en cuenta los resultados obtenidos por Cuellar (1997) quien concluyó que la obscuridad es un estimulante en la formación de callo en caña de azúcar.

Se encontraron diferencias significativas entre variedades (Gráfico 2) independientemente del antioxidante utilizado y del tratamiento de obscuridad, observando un porcentaje más alto en CG 00120 (60%) que en CG 9797 (20%), datos que difieren con los encontrados por Araya (2006), quién para la variedad CG 00120, con una concentración de 2,4-D y BAP (2 mg/L cada uno), tuvo regeneraciones en un 80%. Con la variedad CG 9797 y una concentración de 2,4-D y BAP (2 y 4 mg/L) el mismo autor obtuvo 60% de regeneración callogénica.

A partir de la tercera semana, los explantes de la variedad CG 00120 comenzaron a formar callo. La variedad CG 9797 presentó callogénesis a la quinta semana después de la siembra. En la misma semana, al renovar el medio de cultivo se observó un mayor incremento de la regeneración de tejido callogénico en ambas variedades (Gráfico 2).

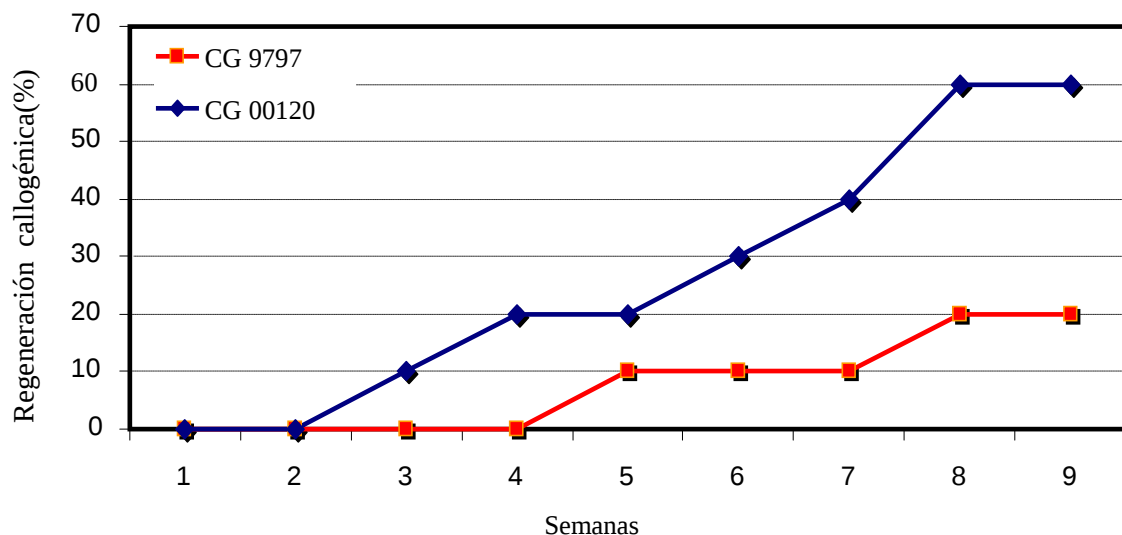
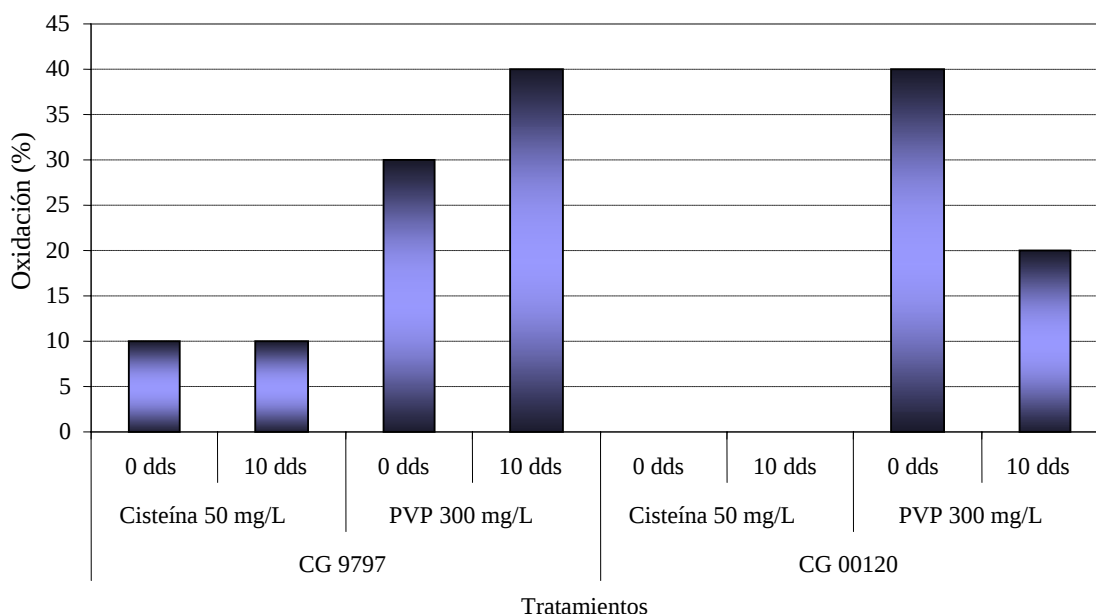


Gráfico 2. Respuesta en la formación de tejido callogénico a la semana nueve durante el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar, CG 00120 y CG 9797, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2007.

Oxidación. No hubo diferencia ($P > 0.05$) entre variedades en la fenolización de los explantes por efecto de la obscuridad. Esto difiere de lo encontrado por Cuellar (1997).



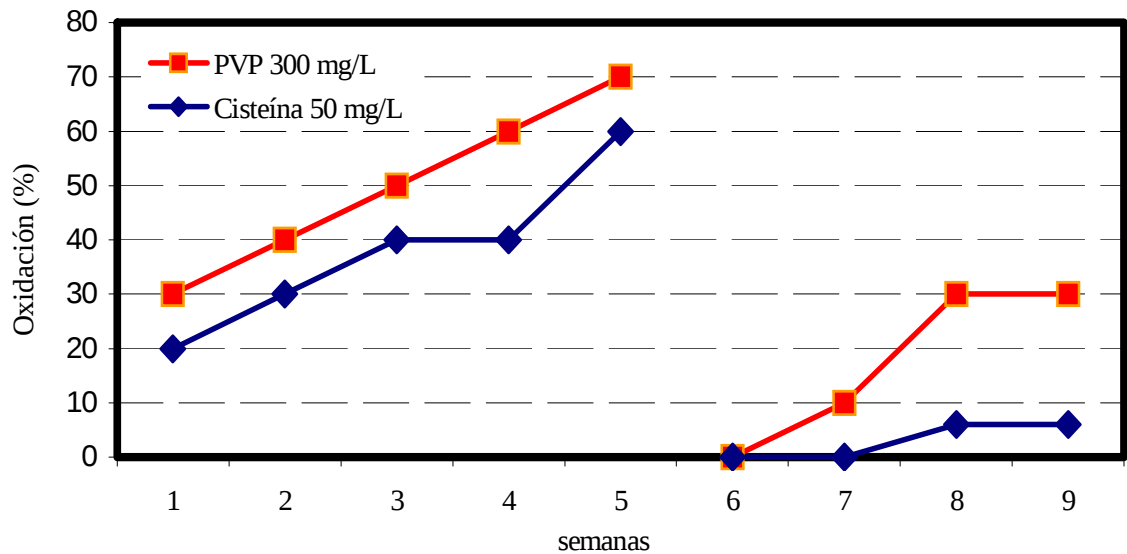
dds = días después de la siembra

PVP = polivinilpirrolidona

Gráfico 3. Efecto de dos antioxidantes (Cisteína y PVP) y 0 y 10 días de exposición a la obscuridad después de la siembra en los porcentajes de oxidación en la novena semana durante del establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar, CG 9797 y CG 00120, Zamorano, Honduras, 2007.

A la quinta semana, la oxidación fue elevada (70%) en los tratamientos con PVP comparado con aquellos con cisteína (60%); dados estos resultados se realizó una transferencia a un medio de cultivo fresco esta semana (Gráfico 4). Esto difiere con lo encontrado por Araya (2006), que evaluando las variedades CG 9797 y CG 00120 con el antioxidante cisteína (50 mg/L) determinó niveles de oxidación severos mayores al 89% en la segunda semana. Laboratorios comerciales recomiendan el recambio del medio de cultivo en la segunda y tercera semana debido a que se presentan oxidación elevadas en los explantes que causan la necrosis en el cultivo y posteriormente baja la regeneración del tejido.

En la novena semana se observó menos oxidación en los tratamientos con cisteína ($P > 0.05$) pero la obscuridad después de la siembra no tuvo efecto significativo ($P > 0.05$) (Gráfico 4).



PVP = polivinilpirrolidona

Gráfico 4. Respuesta en el porcentaje de oxidación de yemas axilares, a la semana nueve durante el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar, CG 00120 y CG 9797, Zamorano, Honduras, 2007.

La cisteína remueve las formaciones de quinonas en el medio de cultivo, favoreciendo una baja oxidación. Esto ayudó en gran medida a tener oxidación de categoría leve a lo largo de las nueve semanas, teniendo un mayor control con la cisteína (6%), comparados al PVP (30%).

Contaminación. La contaminación observada fue baja, logrando una sobrevivencia de 90%, en contraste con Araya (2006) quién tuvo sobrevivencias con las mismas variedades de 0% (Cuadro 1).

Uno de los grandes problemas de esta plantación fueron las ratas, por lo que se hicieron aplicaciones de rodenticidas para evitar enfermedades como la raya roja e infecciones causadas por bacterias. Estas medidas influyeron en la reducción del porcentaje de contaminación en campo y en el laboratorio.

Cuadro 1. Niveles de contaminación a las nueve semanas del establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar, CG 9797 y CG 00120, a partir de yemas axilares. Zamorano, Honduras, 2007.

Variedad	Antioxidante	Obscuridad dds	Contaminación %			
			Hongo	Bacteria	Total	Sobrevivencia
CG 9797	Cisteína (50 mg/L)	0	3.3	10.0	13.3	86.6
		10	1.6	10.0	11.6	88.3
	PVP (300mg/L)	0	6.6	5.0	11.6	88.3
		10	1.6	8.3	10.0	90.0
CG 00120	Cisteína (50 mg/L)	0	3.3	16.6	20.0	80.0
		10	6.6	8.3	15.0	85.0
	PVP (300mg/L)	0	5.0	11.6	16.6	83.3
		10	8.3	10.0	18.3	81.6

dds = días después de la siembra

PVP = polivinilpirrolidona

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una mejor desinfección del material utilizando hipoclorito de sodio al 10% durante una hora, baño María a 50°C por 40 minutos.
- Con el antioxidante cisteína se obtuvo la oxidación más baja.
- La obscuridad no redujo la fenolización de los tejidos ni mejoró la formación de callos.
- La variedad CG 00120 presentó mejor callogénesis (60%) que la CG 9797 (20%) a lo largo de las nueve semanas.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el comportamiento de la variedad CG 00120 en campo.
- Para futuros estudios en caña de azúcar utilizar el antioxidante cisteína a 50 mg/L.
- Realizar el recambio del medio en la tercera a cuarta semana para reducir los daños causados por la oxidación.
- Limpiar el explante al momento de hacer el recambio del medio de cultivo.

LITERATURA CITADA

Araya Contreras, J. 2006. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de caña de azúcar a partir de explantes foliares y yemas axilares. Tesis Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 22 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca,W; Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. Editorial XYZ. 970 p.

Cuellar, J. 1997. Propagación Vegetativa *in vitro* a partir de hojas jóvenes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). (en línea). Consultado el 28 de septiembre 2007. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v08n01_074.pdf

Food Agriculture Organization (FAO). 2006. Perspectivas Alimentarias: Análisis del Mercado Mundial (El Azúcar). (en línea). Consultado el 21 de mayo 2007. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/J8126s/j8126s07.htm#TopOfPage>

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

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

Sánchez-Cuevas, M; Salaverría, J. 2004. Revista Científica UDO Agrícola: Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). (en línea). Consultado 27 de agosto 2007. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/request?cg04002>

Zambrano, A.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). Mracay. CIAGRO-UNEPM. Consultado el 3 de octubre de 2007. Disponible en: http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia%20Tropical/at4501/arti/zambrano_a.htm

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo MS utilizado para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1997.

Componentes	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
KH ₂ PO ₄	170.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.0
Micronutrientes	
KI	0.830
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
Na ₂ MoO ₄	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeNa EDTA	37.300
Componentes Orgánicos	
Mionositol	100.0
Tiamina	1.0
Acido Cítrico	100.0
Agua de Coco (mL/L)	10.0
Caseína hidrolizada	100.0
Sacarosa	30,000.0
Ph	5.7

Fuente: Peña (1997).

Anexo 2. Procedimiento de desinfección y preparación de explantes de dos genotipos de caña de azúcar, CG 9797 y CG 00120, a partir de yemas axilares, Zamorano, Honduras, 2007.

1. Al remover las hojas, se lavaron los tallos de la caña para retirar residuos de tierra.
2. Se cortaron los tallos en trozos de 30 cm y se dejaron durante 32 horas en una solución-bactericida conteniendo Agrymicin y Benlate, a razón de 2 g/L de cada producto.
3. Al remover las cañas de la solución desinfectante, se lavaron los tallos y retiraron con un cepillo los residuos de la solución.
4. Con un bisturí se disectaron las yemas axilares, y se sumergieron en una solución de ácido cítrico (100mg/L) y ácido ascórbico (150mg/L), para evitar fenolización de las mismas.
5. Las yemas se sometieron a un tratamiento térmico, donde se colocaron en un beaker con agua destilada. Se introdujeron en baño de María a 50°C durante 40 minutos.
6. Luego se sumergieron en la solución desinfectante de Agrymicin y Benlate (2 y 2.5 g/L), durante una hora con agitación constante.
7. Los explantes se sumergieron en una solución de alcohol al 70% durante 20 segundos, con agitación constante.
8. Después se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante una hora.
9. Las yemas fueron transportadas luego a la cámara de flujo laminar, donde se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.
10. Luego de los enjuagues, las yemas se mantuvieron en la solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico (100 y 150 mg/L), para evitar la oxidación de las mismas.