

**Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)
-variedad CP 73-1547-**

Adrian Israel Zuñiga Pinto

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)
-variedad CP 73-1547-**

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

Presentado por:

Adrian Israel Zuñiga Pinto

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

**Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*)
-variedad CP 73-1547-**

Presentado por:

Adrian Israel Zuñiga Pinto

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

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

Rafael Solórzano, Ing. Agrónomo
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora

RESUMEN

Zuñiga Pinto, A.I. 2012. Establecimiento *in vitro* caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) -variedad CP 73-1547-. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. Honduras. 25 p.

La caña de azúcar *Saccharum officinarum* es una gramínea tropical que tiene un elevado contenido de sacarosa que la caracteriza como un cultivo muy importante en el sector agrícola. La micropropagación es importante para la propagación masiva de plantas libres de patógenos de la caña de azúcar por lo tanto el objetivo de esta investigación fue evaluar el establecimiento *in vitro* de meristemas apicales de la -variedad CP 73-1547- en tres medios de cultivo a base de Murashige y Skoog (1962) con dos concentraciones de minerales y el medio de White (1963). También se analizó el efecto de tres antioxidantes: cisteína, ácido cítrico y ácido ascórbico, para disminuir la oxidación y por último se evaluó el número de brotes en etapa de multiplicación. Se usó un diseño completamente al azar, con cuatro réplicas para ambos experimentos y una comparación entre tratamientos a través de la prueba T para el análisis del tercer experimento. Los explantes presentaron mejor desarrollo en el medio Murashige y Skoog (1962) modificado y no se encontró diferencia significativa al usar antioxidante en el medio. Para la etapa de multiplicación se determinó que hay mayor número de brotes en explantes provenientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado, sin antioxidante. Se recomienda incluir la solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico en el proceso de desinfección del ápice meristemático, pero no al medio de cultivo.

Palabras clave: Antioxidante, etapa inicial, micropropagación, multiplicación, oxidación, producción masiva.

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.....	15
4. CONCLUSIONES	21
5. RECOMENDACIONES	22
6. LITERATURA CITADA.....	23
7. ANEXOS	25

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros		Página
1.	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado, para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña azúcar -variedad CP 73-1547-.....	6
2.	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado, con sales reducidas a la mitad, para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.	7
3.	Medio de cultivo White (1963) para establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.....	8
4.	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado, para la multiplicación <i>in vitro</i> de caña azúcar -variedad CP 73-1547-.....	13
5.	Efecto de los medios de cultivo en la oxidación de meristemas apicales de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.....	16
6.	Porcentaje de sobrevivencia de los ápices meristemáticos en los tratamientos de medios basales para el establecimiento de caña de azúcar -variedad CP. 73-1547-.	16
7.	Efecto de antioxidantes suplementados al medio de cultivo para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.....	17
8.	Efecto del antioxidante en el número de brotes producidos en la etapa de multiplicación de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.....	19
Figuras		Página
1.	Obtención del ápice de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.....	4
2.	Proceso de desinfección del meristema apical.....	5
3.	Extracción de meristema apical.	10
4.	Proceso de desinfección para experimento II.	12
5.	Desarrollo de meristemas apicales en tres medios basales.	15
6.	Desarrollo de meristemas apicales en cuatro medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado y suplementado con agentes antioxidantes para prevenir fenolización.....	18
7.	Producción de brotes provenientes de explantes del experimento I.	20
8.	Producción de brotes provenientes de explantes del experimento II.	20

Anexos	Página
1. Contaminación de ápices meristemáticos en la evaluación del medio para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.....	25
2. Contaminación de ápices meristemáticos en la evaluación de antioxidantes para el establecimiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.....	25

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea tropical perenne con tallos gruesos y fibrosos que pueden llegar a medir de 3 hasta 5 metros de altura con 5 ó 6 cm de grosor, se desarrolla mejor en suelos francos profundos y bien drenados aunque se puede cultivar en cualquier tipo de suelo con pH de 5.5 a 7.8 siendo 7 el valor óptimo. El clima ideal son zonas calientes con abundante luz solar ya que es muy eficiente en el aprovechamiento de esta, el rango de temperatura varia entre 16 a 30°C, con alturas de 0 a 1000 msnm y una precipitación mínima de 1500 mm de agua por temporada (Ramírez 2008).

La caña tiene un elevado contenido de sacarosa por lo cual es de gran interés para el sector agrícola. Además se puede obtener de ella la materia prima para varios derivados, algunos de estos destinados a la alimentación animal y adicionalmente aporta a la economía de muchos países tropicales. Es el cultivo con mayor eficiencia al momento de captar energía solar para luego almacenarla y convertirla de biomasa a fibra y azúcares fermentados (FAO 1988).

La producción mundial de caña de azúcar es de 1,558 millones de toneladas, cultivadas en aproximadamente 22 millones de hectáreas alrededor del mundo, siendo Brasil el mayor productor con 556 millones de toneladas cosechadas el año pasado (FAO 2012). La mayor parte de la producción mundial es destinada a la obtención de azúcar como también para la elaboración de alcohol etílico que es usado como combustible (Muños Rojas 2004). Actualmente la producción de azúcar en el mundo es de 165,7 millones de toneladas y por primera vez desde el año 2007 supera a las cifra de consumo, dicho incremento en la producción es debido a las exitosas cosechas de Brasil, India y Tailandia (FAO 2011).

Este rubro representa una fuente de trabajo muy estable ya que genera gran cantidad de empleos directos o indirectos en la industria (Díaz y Portocarrero 2002). En Honduras la industria azucarera representa 12.6% correspondiente a 12,223,700 dólares del total de exportaciones de la industria alimentaria nacional, ésta producción proviene de tres zonas del país: 68% de la zona noroccidental, 24% de la zona sur y 8% de la zona central. La industria azucarera está conformada por siete ingenios y 10,000 familias de agricultores independientes que producen 45,454 hectáreas de caña de azúcar; 55% perteneciente a la industria y 45% a los agricultores (SAG 2010).

La variedad de caña de azúcar CP 73-1547 se originó en un programa de desarrollo de variedades ubicado en Canal Point, Florida, Estados Unidos y debido a eso el nombre

lleva las iniciales CP. Los participantes de este programa fueron United State Department of Agriculture - Agricultural Research Service, la universidad de Florida, Florida y la Liga de Caña de Azúcar Inc., quienes determinaron que los dos primeros números representan el año de la primera cosecha clonal y los números después del guión significan el número de acceso en el año que fue nombrado. Esta variedad se caracteriza por desarrollarse mejor en suelos arenosos, tener un contenido alto de azúcar y macollamiento medio, facilidad de la cosecha y principalmente es tolerante a condiciones de suelo freático (Schueneman *et al.* 2008).

Debido a la importancia de la caña de azúcar en la actualidad se ha buscado un método de producción masiva donde obtengamos plantas vigorosas y sobre todo libres de patógenos, (Muños Rojas 2004). El cultivo de Tejidos Vegetales es principalmente usado para cultivar bajo condiciones asépticas tejidos, órganos, células o protoplastos en un medio artificial, bajo condiciones de temperatura e iluminación apropiada para el crecimiento (Barba Álvarez *et al.* 2001).

Las investigaciones de caña de azúcar para la propagación *in vitro* comenzó en Hawaii en 1961 y desde entonces se ha convertido en una metodología muy usada e importante para el mejoramiento del cultivo (Naik 2001). Por lo cual se pretende maximizar la producción de plántulas de esta variedad de caña de azúcar utilizando menor espacio para una producción masiva, con el principal propósito de obtener plantas sanas, vigorosas y libres de patógenos. Aumentando la producción en campo de la materia prima y a su vez la elaboración del producto con valor agregado que en este caso es el azúcar.

Los objetivos de este estudio fueron: determinar el medio de cultivo más adecuado para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-. Evaluar agentes antioxidantes suplementados al medio de cultivo y su efecto en el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-. Evaluar el número de brotes en etapa de multiplicación de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Experimento I: Evaluación de medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-: Material vegetal y fuente de explante. Se utilizó plantas de caña de azúcar -variedad CP 73-1547- de cuatro meses de edad provenientes de la finca del Ingenio Tres Valles de Francisco Morazán. De las plantas se extrajeron los meristemas apicales (Figura 1) que fueron usados como explante; los cuales, se sometieron a un proceso de desinfección (Figura 2) que consistió en sumergir los meristemas en una solución de NaClO al 1% (v/v) (cloro comercial al 4.72% de ingrediente activo) con dos gotas de Tween 80 por cada 100ml durante cinco minutos. El Tween 80 es un agente tenso activo (ingrediente activo: polioxietileno 20, polisorbato 80) que disminuye la tensión superficial de la solución desinfectante y permite mejor contacto con el material vegetal.

Luego se colocó los explantes con agua destilada estéril en baño maría a 50-55°C por ocho minutos. A continuación se sumergió el material en una solución de ácido cítrico 0.2 g/L durante cinco minutos. Para finalizar el proceso de desinfección se sumergió en una solución de NaClO al 1% (v/v) por 15 minutos y dentro de la cámara de flujo laminar se decantó la solución de NaClO y se extrajo los meristemas para su siembra.

Se decidió utilizar meristemas apicales porque contienen células con la capacidad de diferenciarse (Muñoz Rojas 2004). Además se prefiere este tipo de explante porque presentan menos problemas de fenolización y están libres de contaminación (Pérez Ponce 1991), por lo cual se puede obtener explantes con menor probabilidad de contaminación al momento de la desinfección y siembra.

Preparación del medio de cultivo. Se probaron tres medios de cultivo, dos basados en el de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con 0.026 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina) (Cuadro 1 y 2). El tercer medio (Cuadro 3) fue el de White (1963), sin añadir BAP. En la preparación de los medios de cultivo y soluciones se utilizó agua destilada, se ajustó el pH a 5.8 utilizando HCL y/o KOH y se dispensó 2 ml de medio en frascos, estos se sellaron con papel aluminio. Los frascos con los medios se esterilizaron en autoclave a 15 PSI, 120°C durante 20 minutos.

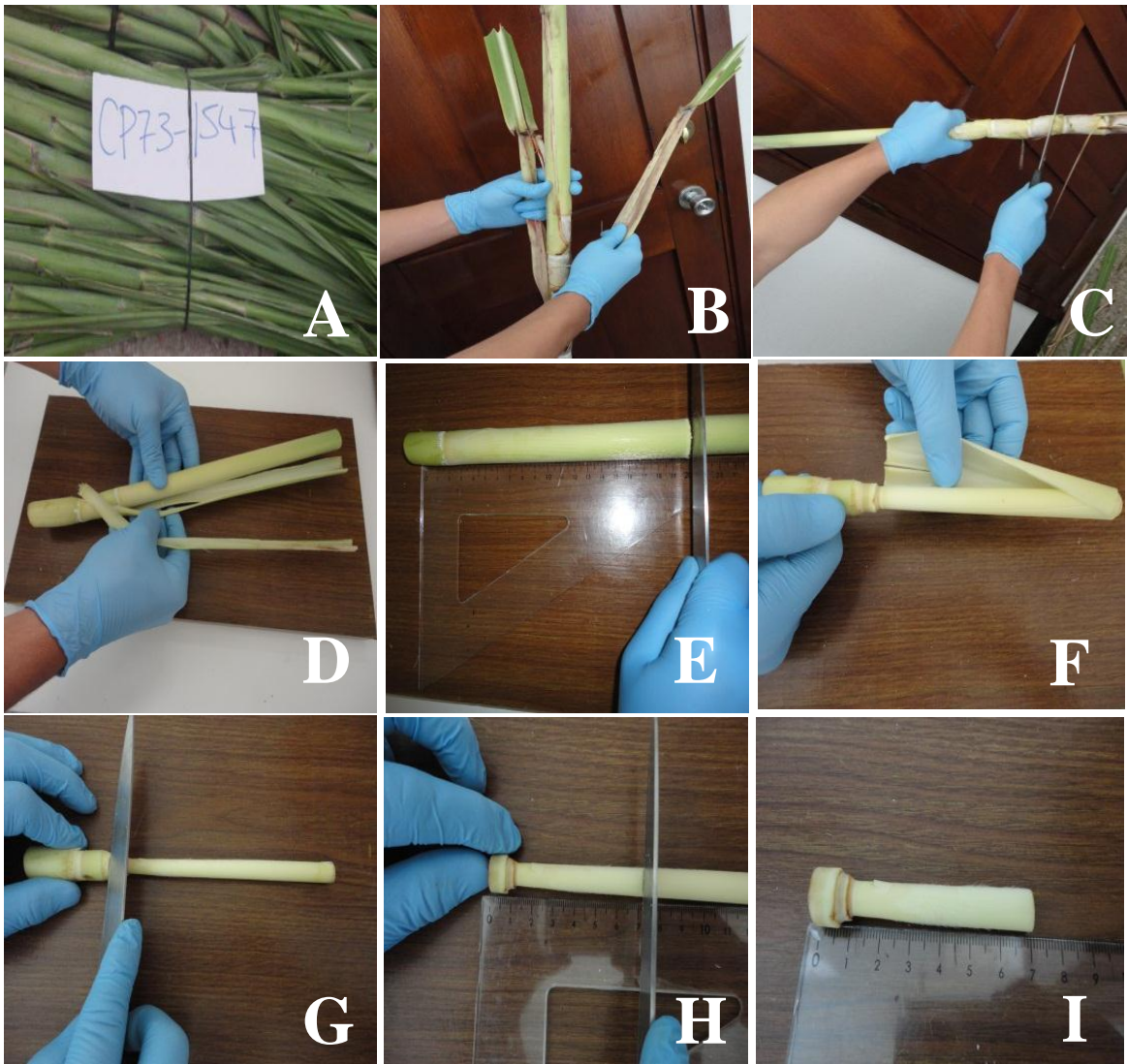


Figura 1. Obtención del ápice de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-. A- plantas de caña de azúcar, B- remoción de hojas externas, C- corte del tallo, D- remoción de hojas internas, E- corte del ápice a 20cm, F- remoción de hojas internas hasta dejar ápice de 2cm de diámetro, G- corte de base, H- corte de ápice a 7cm de largo, I- ápice que contiene el meristema apical.

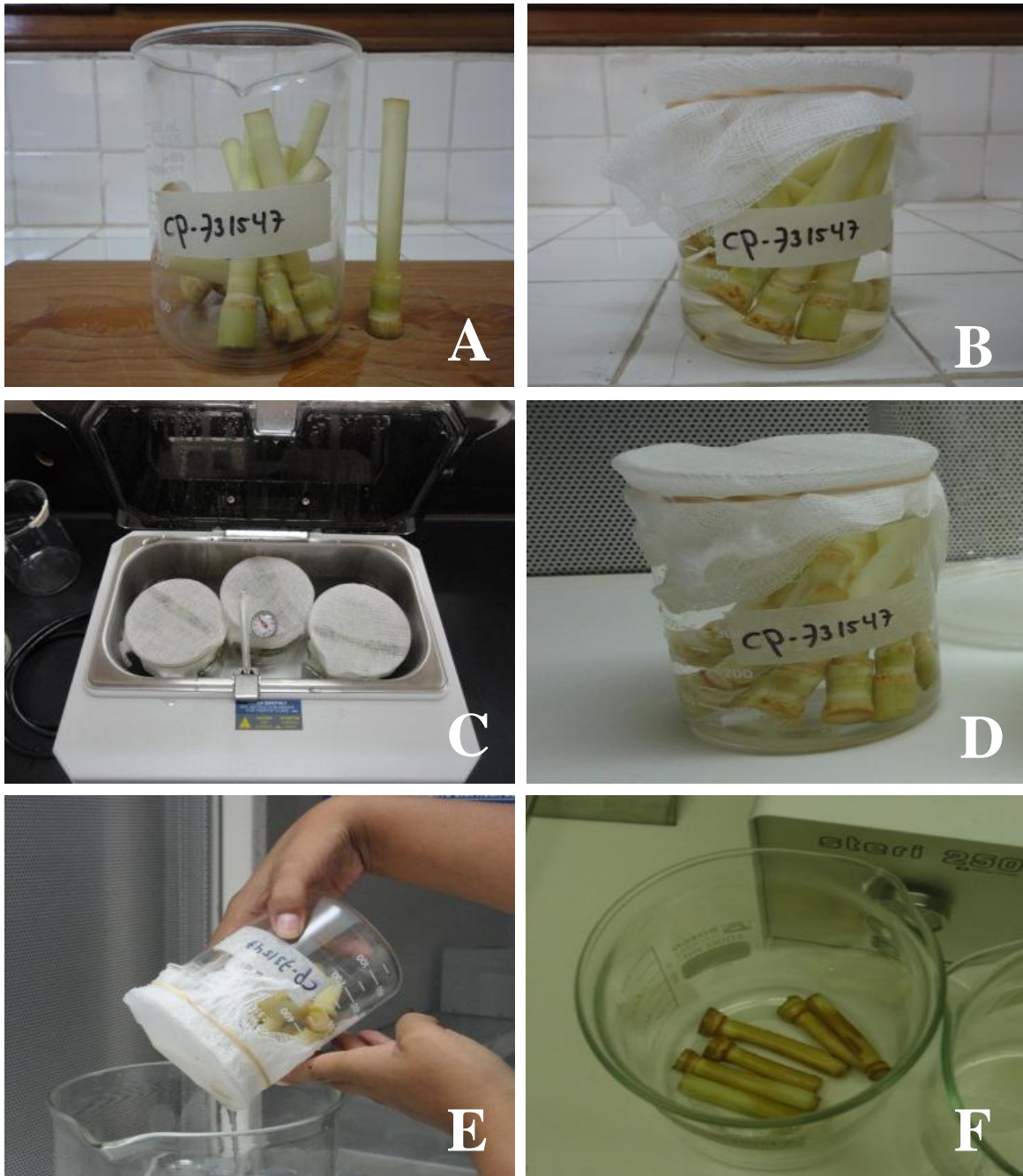


Figura 2. Proceso de desinfección del meristema apical. A- ápice meristemático, B- ápices sumergidos en agua destilada estéril, C- meristemas en baño maría a 50-55°C por ocho minutos, D- material vegetativo sumergido en solución de NaClO al 1% (v/v) por 15 minutos, E- remoción de la solución de NaClO al 1% (v/v), F- meristemas apicales desinfectados.

Cuadro 1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado, para el establecimiento *in vitro* de caña azúcar -variedad CP 73-1547-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macro elementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1,900.000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1,650.000
Micro elementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	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	0.830
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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	20,000.000

Fuente: Kyte 1987

Cuadro 2. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado, con sales reducidas a la mitad, para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macro elementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	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
Micro elementos	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	20,000.0000

Fuente: Kyte 1987

Cuadro 3. Medio de cultivo White (1963) para establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de calcio tetrahidratado	200.00
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	360.00
	KCl	Cloruro de potasio	65.00
	KNO_3	Nitrato de potasio	80.00
	Na_2SO_4	Sulfato de sodio	200.00
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	1.50
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	5.00
	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
Componentes Orgánicos		Ácido Nicotínico	0.50
		Piridoxina	0.50
		Tiamina-HCL	0.10
		Glicina	3.00
		Sacarosa	20,000.00

Fuente: Jalaja *et al.* 2008

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 Steri 250 por 15 segundos. Se extrajo el meristema apical (Figura 3), quitando una por una las hojas de envoltura; dejándolo de aproximadamente 1.5 cm de largo, este proceso se realizó con la ayuda de pinzas y bisturís estériles.

Una vez listos los meristemas se procedió a colocarlos en los frascos con medio estéril para luego ser incubados a 22°C, 60% de humedad relativa y 16 horas luz (Silvanya Daylight Incandescent 75 W) con una intensidad de 1800 Lux. El medio de cultivo de cada explante fue cambiado por uno del mismo tipo cada 5 días a partir del día que fue sembrado, con un total de seis cambios antes de pasar a la etapa de multiplicación.

Diseño experimental. Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) debido a que las condiciones ambientales donde se realizó el experimento son completamente homogéneas. El análisis se lo realizó a tres tratamientos con cuatro repeticiones cada uno y 4 unidades observacionales en cada repetición.

Datos evaluados. Durante la etapa de establecimiento se evaluó el número de meristemas muertos por oxidación y meristemas sobrevivientes.

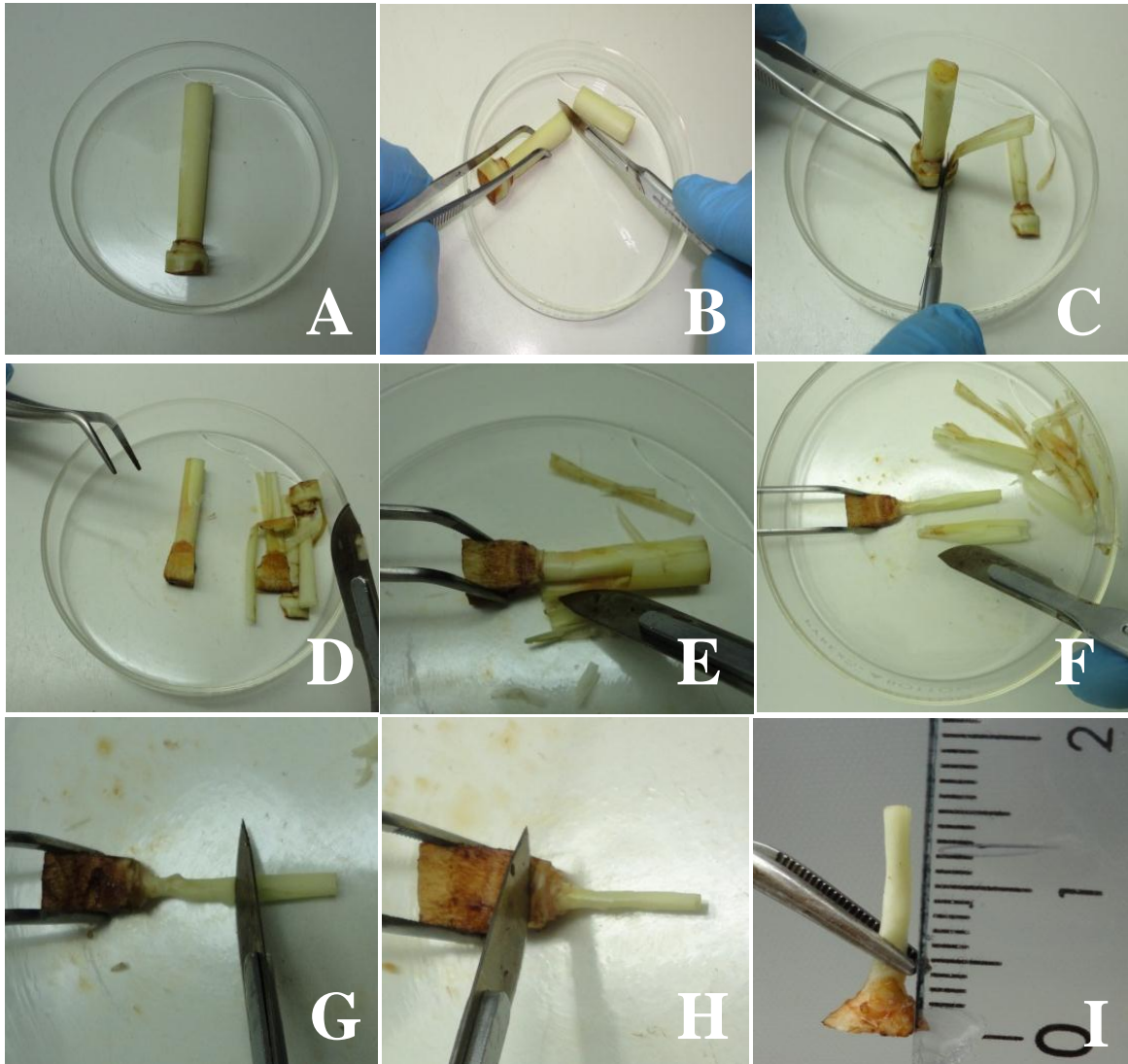


Figura 3. Extracción de meristema apical. A- ápice, B- corte longitudinal, C- corte lateral, D,- ápice después de reducción, E- remoción de hojas de envoltura, F- ápices después de remoción de hojas, G- corte longitudinal, H- corte de la base, I- ápice conteniendo meristema apical.

Experimento II: Evaluación de antioxidantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-: Material vegetal y fuente de explante. Se utilizó plantas de 4 meses de edad provenientes de la finca del Ingenio Tres Valles de Francisco Morazán, de las plantas se extrajeron los meristemas apicales (Figura 1) que fueron usados como explante; todos los ápices donde se encuentran los meristemas se sumergieron en una solución de antioxidante de 300 mg/L de ácido cítrico en combinación de 300 mg/L de ácido ascórbico por 60 minutos, seguido de una desinfección de NaClO al 1% (v/v) con dos gotas de Tween 80 por cada 100ml durante cinco minutos.

Luego se colocó los ápices con agua destilada estéril en baño maría a 50-55°C por ocho minutos. A continuación se sumergió el material en una solución de 150 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L de ácido ascórbico durante cinco minutos. Para finalizar el proceso de desinfección (Figura 4) se sumergió en una solución de NaClO al 1% (v/v) por 15 minutos y dentro de la cámara de flujo laminar se decantó la solución de NaClO y se extrajo los meristemas para su siembra.

Preparación del medio de cultivo. Se probaron diferentes concentraciones de agentes antioxidantes en medios de cultivo basados en Murashige y Skoog (1962) (Cuadro 1). Teniendo un medio basal como testigo sin antioxidante y tres medios suplementados con los antioxidantes cisteína 20 mg/L, ácido cítrico 50 mg/L o ácido ascórbico 50 mg/L.

Para la preparación de los medios de cultivo y soluciones se utilizó agua destilada, se ajustó el pH a 5.8 utilizando HCL y/o KOH. Se dispensó 2 ml de medio en frascos y estos se sellaron con papel aluminio. Los frascos con los medios se esterilizaron en autoclave a 15 PSI, 120°C durante 20 minutos y luego fueron llevados a la cámara de flujo laminar.

Preparación y siembra del material vegetal. Se utilizó el mismo procedimiento llevado a cabo para el experimento I.

Diseño experimental. Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) teniendo cuatro tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, y tres unidades experimentales por repetición.

Datos evaluados. Se evaluó el número de meristemas muertos por oxidación al final de la etapa de establecimiento del cultivo (a los 30 días).



Figura 4. Proceso de desinfección para experimento II. A- meristemos apicales, B- meristemos sumergidos en solución antioxidante de 300 mg/L de ácido cítrico con 300 mg/L de ácido ascórbico por 60 minutos, C- ápices con agua destilada estéril en baño maría a una temperatura de 50-55°C por ocho minutos, D- meristemos sumergidos en solución de NaClO al 1% (v/v) por 15 minutos.

Experimento III: Evaluación del número de brotes en etapa de multiplicación de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-: Preparación de los Medios de Cultivo. Se usó medio sólido basado en el medio Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987) (Cuadro 4). Uno de los tratamientos fue suplementar con 50 mg/L de ácido ascórbico, al otro no se le agregó este antioxidante. Para la preparación de todas las soluciones y medios de cultivos se utilizó agua destilada estéril, Phytigel 1.8 g/L, pH ajustado 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 Murashige y Skoog (1962) modificado, para la multiplicación *in vitro* de caña azúcar -variedad CP 73-1547-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macro elementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1,900.000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1,650.000
Micro elementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	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	0.830
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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	0.200
		Glicina	2.000
		Ácido nicotínico	0.500
		Piridoxina	0.500
		Sacarosa	20,000.000

Fuente: Kyte 1987.

Cambio de medio. El cambio de medio de etapa de establecimiento a etapa de multiplicación se realizó después de 35 días desde el establecimiento para el experimento I y a los 25 días de establecimiento para el experimento II. Se realizaron dos cambios de medio cada 21 días hasta etapa II.2.

Análisis estadístico. Se realizó una prueba T y un análisis de varianza con nivel de significancia ≤ 0.05 .

Datos evaluados. Se evaluó el número de brotes provenientes de cada explante al iniciar etapa II.2 en el medio Murashige y Skoog (1962) modificado con y sin antioxidante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento I: Evaluación de medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-. El análisis estadístico de las medias relacionadas con la oxidación de los explantes muestra que si existe diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro 5). Dando como resultado que el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) tuvo el menor porcentaje de oxidación (13.33%), por lo cual se considera que fue el medio mas apropiado para el establecimiento *in vitro* de la variedad de caña CP 73-1547 (Figura 5). Lo cual va a acorde con Naik (2001) quién argumenta que según investigaciones en micropropagación de caña de azúcar, este medio es preferido para el crecimiento de células debido a que se caracteriza por altas concentraciones de sales minerales.

Además se conoce que Pérez Ponce (1991) también obtuvo los mejores resultados con el medio MS para la micropropagación de caña. El segundo tratamiento $\frac{1}{2}$ Murashige y Skoog (1962) con modificaciones en los macro y micro elementos; reducidos a la mitad, tuvo una mayor oxidación (26.25%) en comparación al MS completo.

Estudios realizados por Naik (2001) muestran que el medio MS presenta mejores resultados que el medio White en cuanto a crecimiento y desarrollo. En este experimento se pudo corroborar esto con el tratamiento del medio White ya que tuvo mayor oxidación y menor desarrollo del explante lo que impidió el establecimiento del explante.



Figura 5. Desarrollo de meristemas apicales en tres medios basales. A- explante en medio Murashige y Skoog (1962) modificado, B- explante en medio $\frac{1}{2}$ Murashige y Skoog (1962) modificado, C- explante en medio White (1963).

Cuadro 5. Efecto de los medios de cultivo en la oxidación de meristemas apicales de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

Tratamientos	Oxidación (%)
Medio Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987)	13.33 ^b
Medio ½ Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987)	26.25 ^{ab}
Medio White (1963) (Jalaja <i>et al.</i> 2008)	40.00 ^{ae}

^e Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$).

La variable porcentaje de sobrevivencia (Cuadro 6) no presentó ninguna diferencia significativa entre tratamientos. El resultado de la evaluación de esta variable se explica con lo expuesto por Chavarría *et al.* (1999), quienes afirman que el medio líquido mantiene mayor número de explantes vivos porque evita la muerte del mismo distribuyendo los fenoles por todo el medio de cultivo.

Cuadro 6. Porcentaje de sobrevivencia de los ápices meristemáticos en los tratamientos de medios basales para el establecimiento de caña de azúcar -variedad CP. 73-1547-.

Tratamientos	Sobrevivencia de explantes (%)
Medio Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987)	51.67 ^a
Medio ½ Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987)	37.50 ^{ab}
Medio White (1963) (Jalaja <i>et al.</i> 2008)	35.00 ^a

^b Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($P \geq 0.05$).

En el experimento se observó un porcentaje de contaminación de 32.20% en relación al total de explantes sembrados. La contaminación no influye en las conclusiones del objetivo analizado en esta investigación porque el factor contaminación no está relacionado a la eficacia del medio de cultivo sino a otros factores externos a este, como el ambiente, la manipulación del explante al momento de la siembra y la mala desinfección del material de siembra o mala sanitización del individuo a cargo.

Experimento II: Evaluación de antioxidantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-. Durante el desarrollo del experimento I hubo mucha dificultad en el crecimiento de los explantes debido a la oxidación. La fenolización u oxidación se puede definir como la liberación de radicales libres o compuestos fenólicos que pueden causar la muerte del explante. Las principales causas para la oxidación pueden ser el efecto corrosivo causado por el agente desinfectante en el proceso de desinfección, el daño provocado al explante durante la manipulación, la composición del medio de cultivo, y la cantidad de medio en el frasco e incluso la calidad de frasco (Azofeifa 2009).

Para reducir el efecto de oxidación Valdez Balero *et al.* (2002) recomiendan utilizar agentes químicos antifenolizantes. Por lo cual se decidió realizar este segundo

experimento utilizando el medio más favorable para el establecimiento de esta variedad de caña de azúcar y agregar cisteína, ácido cítrico o ácido ascórbico como agentes antioxidantes, estos actúan demorando la oxidación o previniendo la formación de fenoles (Azofeifa 2009).

En este experimento se evaluó el porcentaje de oxidación que presentaron los explantes en cada uno de los tratamientos, y se observó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 7).

No se observó oxidación en los tratamientos Murashige y Skoog + Cisteína y Murashige y Skoog + Ácido Ascórbico (Figura 6). Resultado que coincide con la publicación de Azofeifa (2009), donde muestra que para la reducción de fenoles en los explantes se obtiene mejor resultado con ácido ascórbico. Sin embargo, esto contrasta con los resultados obtenidos por Valdez Balero *et al.* (2002), en este estudio observaron que el mejor antioxidante para reducir la oxidación fenólica es el ácido cítrico. Se obtuvo 6.24% de contaminación en el experimento; 4.16% causado por hongo y 2.08% por bacteria.

Cuadro 7. Efecto de antioxidantes suplementados al medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

Tratamientos	Antioxidante (mg/L)	Oxidación (%)
MS*	00	8.33 ^{b‡}
MS + Cisteína	20	0.00 ^b
MS + Ácido Cítrico	50	16.67 ^b
MS + Ácido Ascórbico	50	0.00 ^b

* MS= Murashige y Skoog (1962) modificado (Kyte 1987)

‡ Letras iguales no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($P \geq 0.05$).



Figura 6. Desarrollo de meristemas apicales en cuatro medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado y suplementado con agentes antioxidantes para prevenir fenolización. A- explante en medio MS + Ácido Cítrico, B- explante en medio MS, C- explante en medio MS + Cisteína, D- explante en medio MS + Ácido Ascórbico.

Experimento III: Evaluación del número de brotes en etapa de multiplicación de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-. Los meristemas establecidos en el experimento I y II fueron transferidos a dos medios de cultivo para multiplicación, MS modificado y MS modificado y suplementado con ácido ascórbico. Se evaluó el número de brotes en la etapa de multiplicación a los 42 días del cambio de medio para multiplicación. Por medio de la prueba T se determinó que no hay diferencia significativa en el número de brotes formados en cada medio para los explantes provenientes del experimento I (Cuadro 8). Lo cual indica que en ambos medios se pueden dar el mismo número de brotes hasta la etapa II.2 (Figura 7), sin la necesidad de suplementar el medio con ácido ascórbico.

Sin embargo, según análisis estadístico se determinó que para los brotes provenientes del experimento II si hubo diferencia significativa entre medios de cultivo, según prueba T ($P \leq 0.05$). Por lo cual para el experimento II el medio sí influyó en la producción de brotes hasta la etapa II.2 (Figura 8), siendo el medio MS modificado y sin antioxidante el que mayor número de brotes produjo en los explantes.

Esta respuesta se puede explicar por el cambio que se realizó en el proceso de desinfección para el segundo experimento. Este cambio consistió en sumergir los ápices meristemáticos en una solución antioxidante de ácido cítrico en combinación con ácido ascórbico, lo cual no se realizó en el proceso de desinfección empleado para los explantes provenientes del primer experimento. Al sumergir los ápices en dicha solución se controló eficazmente la oxidación de los explantes durante el proceso de desinfección por lo cual los explantes se mantuvieron con mayor vigorosidad y así mismo produjo este efecto en la etapa de multiplicación, explicando porque en los brotes provenientes del segundo experimento si hubo diferencia significativa entre tratamientos.

Cuadro 8. Efecto del antioxidante en el número de brotes producidos en la etapa de multiplicación de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

Experimento	Medio de cultivo	Explantes	Media ^Ω	Valor T	Pr > t
I	MS*	28	1.96	0.30	0.76
	MS + Ácido ascórbico	13	2.15	0.31	0.75
II	MS	17	1.94	2.08	0.04
	MS + Ácido ascórbico	16	0.81	2.12	0.04

* MS= Murashige y Skoog (1962) (Kyte 1987)

^Ω Media= Promedio de número de brotes producidos por explante.

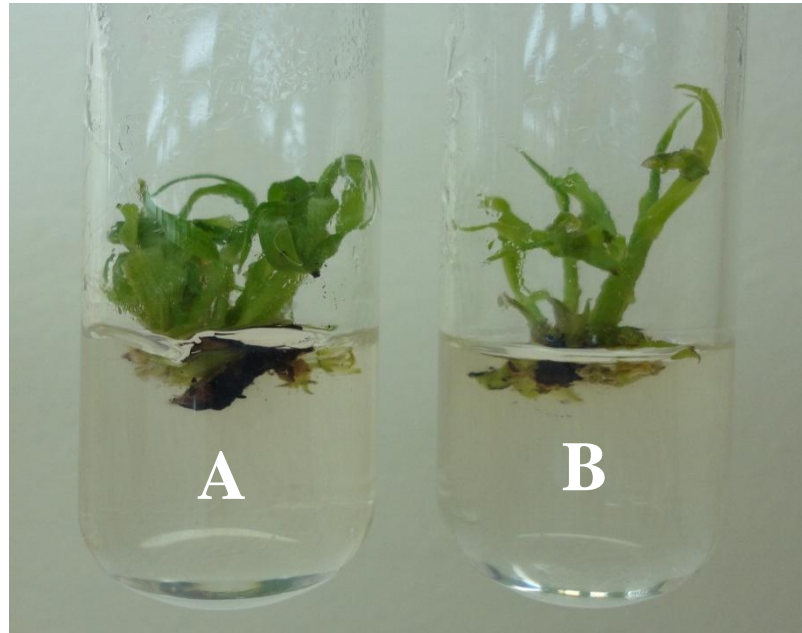


Figura 7. Producción de brotes provenientes de explantes del experimento I. A- brotes en medio Murashige y Skoog (1962) modificado, B- brotes en medio MS modificado y suplementado con ácido ascórbico.

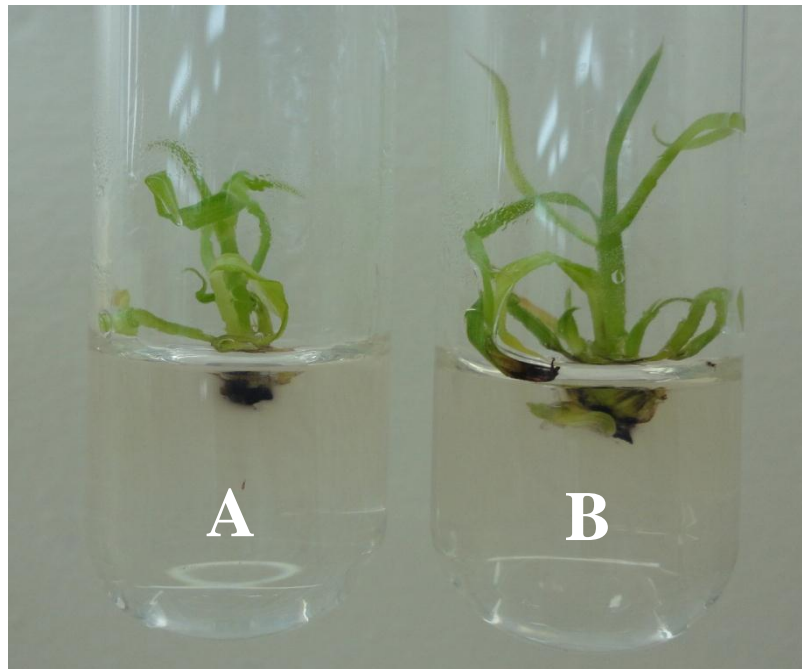


Figura 8. Producción de brotes provenientes de explantes del experimento II. A- brotes en medio Murashige y Skoog (1962) modificado y suplementado con ácido ascórbico, B- brotes en medio Murashige y Skoog (1962).

4. CONCLUSIONES

- Para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) -variedad CP. 73-1547- es favorable utilizar el medio Murashige y Skoog (1962) modificado.
- Se determinó que no hay diferencia significativa al suplementar con antioxidante el medio de cultivo, por lo cual no es necesario suplementar el medio con agentes químicos antifenolizantes.
- En la etapa de multiplicación (subcultivo dos) se obtuvo 1.94 brotes por explante en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado sin antioxidante.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda incluir la solución antioxidante de ácido cítrico con ácido ascórbico en el proceso de desinfección del ápice meristemático, ya que reduce la fenolización y promueve el buen desarrollo de este en etapa inicial de establecimiento.
- Continuar con el experimento para la determinación de medio adecuado en la etapa de multiplicación.
- Realizar la aclimatación de plántulas en invernadero y su respectiva evaluación en campo.

6. LITERATURA CITADA

Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Agronomía Mesoamericana vol. 20(1): 153-175.

Barba Álvarez, A., Luna Rosales, B. y Romero Arredondo, J. 2001. Micropropagación de Plantas. México, Editorial Trillas, S.A. de C.V. 107 p.

Chavarría, E., Jiménez, B. y Yeh, F. 1999. Protocolo para la reproducción masiva *in vitro* de caña de azúcar en Costa Rica. XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. San José, Costa Rica. Resumen 164, p. 207 y 208.

Díaz, L.L. y Portocarrero, E.T. 2002. Manual de producción de caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*). Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 130 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 1988. La caña de azúcar como pienso. Memorias de una consulta de expertos de la FAO, Santo Domingo, RD., 1986. 319 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2011. Perspectivas alimentarias: Análisis de los mercados mundiales. Resumen del mercado de azúcar. p 6.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2012. Agronoticias America Latina y el Caribe. Reducen el pronostico en la producción de caña de azúcar en Brasil (en línea). Consultado 22 sept. 2012. Disponible en http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/?dyna_fef%5Buid%5D=149130

Jalaja, N., Neelamathi, D. y Sreenivasan, T. 2008. Micropropagation for Quality Seed Production in Sugarcane in Asia and the Pacific. 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. 46.

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

Muños Rojas, J. 2004. La micropropagación de caña de azúcar y sus implicaciones. España, EEZ-CSIC. 20 p.

Naik, G.R. 2001. Sugarcane Biotechnology. Tissue culture studies in sugarcane. SCIENCE PUBLISHERS, INC. United States of America. p 25-50.

Pérez Ponce, J. 1991. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. *In*: Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds) Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. p 543-558.

Ramírez, M.A. 2008. Cultivos para la producción sostenible de biocombustible: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos. Caña de azúcar. Servicio Holandés de Cooperación al Desarrollo SNV, módulo V. 16 p.

Schueneman, T.J., Miller, J.D., Gilbert, R.A., y Harrison, N.L. 2008. Sugarcane Cultivar CP 73-1547 Descriptive Fact Sheet (en línea). University of Florida IFAS Extension/EDIS. Consultado 10 sept. 2012. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu/ag131>

SAG (Secretaría de Agricultura y Ganadería, Honduras). 2010. Producción de caña de azúcar en Honduras. (en línea). Gobierno de Unidad Nacional, Honduras. Consultado 3 sept. 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.

Valdez Balero, A., Orellana Pérez, P.A., García Rodríguez, L., Veitia Rodríguez, N., Bermudez Carabaloso, I., García Rodríguez, 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. Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas, Cuba. Biotecnología vegetal vol. 2: 31-37.

7. ANEXOS

Anexo 1. Contaminación de ápices meristemáticos en la evaluación del medio para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

Experimento I	
Patógeno	Contaminación (%)
Hongo	15.25
Bacteria	16.95
Total	32.20

Anexo 2. Contaminación de ápices meristemáticos en la evaluación de antioxidantes para el establecimiento *in vitro* de caña de azúcar -variedad CP 73-1547-.

Experimento II	
Patógeno	Contaminación (%)
Hongo	4.17
Bacteria	2.08
Total	6.25