

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**EFFECTO DE LA 6-BENCILAMINOPURINA EN LA PROLIFERACIÓN DE BROTES
in vitro DE TRES VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*
L.)**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

MAK MÍLAN CRUZ SIC

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, FEBRERO DEL 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR MAGNÍFICO

Dr. M. V. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

**DECANO
VOCAL PRIMERO
VOCAL SEGUNDO
VOCAL TERCERO
VOCAL CUARTO
VOCAL QUINTO
SECRETARIO**

**Dr. Ariel Abderraman Ortiz López
Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel
Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle
Ing Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
Br. Luis Antonio Raguay Pírique
Br. Juan Manuel Corea Ochoa
Ing. Agr. Pedro Peláez Pérez**

Guatemala, febrero del 2004

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

EFFECTO DE LA 6-BENCILAMINOPURINA EN LA PROLIFERACIÓN DE BROTES *in vitro* DE TRES VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Presentado como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo de ustedes.

Atentamente,

Mak Milan Cruz Sic

ACTO QUE DEDICO

A:

- DIOS** Fuente eterna de sabiduría, que me ha dado la vida, la paciencia necesaria, y las herramientas para que cumpla otro de mis objetivos.
- MIS PADRES** Rosalio Cruz Gómez y Josefina Sic.
Como muestra de agradecimiento, que éste triunfo sea la recompensa a los múltiples esfuerzos y sacrificios. Gracias por su presencia.
- MIS HERMANOS** Rosalio, Cenobia y en especial a Ely
Gracias por el apoyo incondicional a lo largo de la culminación de mi carrera.
- MI ESPOSA** Delia Floridalma Xitumul
Por el apoyo incondicional y paciencia, en los momentos más difíciles de la vida para alcanzar ésta meta.
- MIS HIJAS** Evelyn Andrea y Alexa Jimena
Regalos divinos, que mi triunfo sea un ejemplo a superar, que Dios las bendiga.
- MIS SOBRINOS** Luis, Fernanda, Rosio, Steven, Yesenia y Adolfo.
Con cariño especial.
- MI SUEGRA** Concepción Melchor
Con aprecio y respeto.
- MIS CUÑADOS (AS)** Con aprecio, y agradecimiento especial a Rolando Xitumul.
- MIS AMIGOS Y
COMPAÑEROS DE
TRABAJO** William Capriel, Jorge Mendoza, Henry Aj, Victor Suyén, Ana Melgar, Silvia García, Mauricio Rosales, Alfredo Cabrera, Carlos Bolaños, Julio Peña, Arturo Salas, Gustavo Jacinto, Alfonso Vásquez, Pedro Ampuria, Miriam de la Roca, Rolando Aragón, Felipe Esquequé, Elsitá Vásquez y en especial a Esperanza de León.
Como recuerdo de las experiencias compartidas y muestra de sincera amistad.

TESIS QUE DEDICO

A:

GUATEMALA

ESCUELA NACIONAL URBANA PARA VARONES “RABINAL, BAJA VERAPAZ”.

INSTITUTO “ADOLFO V. HALL DEL NORTE” SAN PEDRO CARCHÁ, A.V.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

FACULTAD DE AGRONOMÍA.

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS DE LA SUBÁREA DE MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS.

CENTRO GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR, “CENGICAÑA”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a las personas que colaboraron de alguna y/o otra manera, en el desarrollo de la presente investigación:

A:

MIS ASESORES

Ing. Agr. Msc. Domingo amador Pérez
Dr. Gregorio Soto (Q.E.P.D.)

Por su incondicional aporte para la realización y orientación de la presente investigación.

ING. AGR. MARCO VINICIO FERNÁNDEZ

Por el apoyo y paciencia en la realización del Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía (E.P.S.A.)

ING. AGR. ERIC ORTEGA

Por su acertada asesoría y consejos en el área estadística.

ING. AGR. FRANCISCO COSME

Por su amistad brindada durante la culminación de mi carrera.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DEL CENTRO GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR, “CENGICAÑA”

Por el apoyo brindado en la ejecución del E.P.S.A. y de la presente investigación.

EL PERSONAL TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO DE CENGICAÑA

Fernando Hernández, Estuardo Catalán, Rony G., Venancio R., Ing. Agr. Werner Ovalle y al Ing. Ovidio Pérez.

Por la amistad brindada y apoyo en la fase de campo y laboratorio.

CONTENIDO

ÍNDICE	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
APÉNDICE.....	x
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	01
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	03
3. MARCO TEÓRICO.....	05
3.1 Marco Conceptual.....	05
3.1.1 El cultivo de la caña de azúcar.....	05
3.1.1.1 Clasificación taxonómica del Cultivo.....	06
3.1.1.2 Descripción general del cultivo.....	06
A. Morfología.....	06
3.1.2 Micropropagación.....	09
3.1.2.1 Aplicaciones del Cultivo de Tejidos.....	09
3.1.2.2 Fases de la Micropropagación.....	10
3.1.2.3 Factores que influyen en la Micropropagación.....	11
3.1.2.4 Oxidación.....	14
A. Antioxidantes.....	15
3.1.2.5 Desinfestación de materiales vegetales.....	17
3.1.2.6 Condiciones de laboratorio.....	18
3.1.3 Reguladores de crecimiento.....	19
3.1.3.1 Auxina.....	20
A. Función de las auxinas en la formación de las raíces.....	21
B. Utilización de auxinas para estimular el Enraizamiento.....	21
3.1.3.2 Citocinina.....	22
A. Concepto de Citocinina.....	22
B. Citocininas análogas sintéticas.....	23
a. Bencilaminopurina.....	24
C. Lugares de síntesis de las citocininas.....	24
D. Mecanismo de acción.....	25
E. Efectos fisiológicos de las citocininas.....	25
F. Interacción auxina-citocinina.....	26
3.1.4 Cultivo de tejidos en caña de azúcar.....	27
3.1.4.1 Micropropagación.....	28
3.1.4.2 Medios de cultivo en caña de azúcar.....	29
3.1.4.3 Técnicas de cultivo de tejidos en caña de azúcar.....	29
3.2 Marco Referencial.....	31
3.2.1 Ubicación del área en estudio.....	31
3.2.2 Características generales de las variedades de caña de azúcar utilizadas Para el ensayo.....	33
3.2.2.1 Variedad CP 722086.....	33
3.2.2.2 Variedad SP 792233.....	33
3.2.2.3 Variedad PR 872080.....	34
4. OBJETIVOS.....	35

4.1	Objetivo General.....	35
4.2	Objetivos Específicos.....	35
5.	HIPÓTESIS.....	36
6.	METODOLOGÍA.....	37
6.1	Localización del experimento.....	37
6.2	Material vegetal, equipo, cristalería, reactivos, insumos y medio de cultivo usados para la realización del estudio.....	37
6.2.1	Material vegetal experimental.....	37
6.2.2	Preparación de medios de cultivo.....	37
6.3	Fase experimental.....	41
6.3.1	FASE I.....	41
6.3.2	FASE II.....	43
6.4	Diseño experimental.....	44
6.5	Modelo estadístico.....	44
6.6	Descripción de los tratamientos.....	45
6.7	Unidad experimental.....	45
6.8	Variables respuesta.....	46
6.8.1	Número de brotes.....	46
6.8.2	Longitud de brotes.....	46
6.8.3	Número de por brotes.....	46
6.9	Análisis de la información.....	46
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
7.1	FASE I, INICIAL: PRUEBA DE ANTIOXIDANTES.....	48
7.2	FASE II, DE MULTIPLICACIÓN: EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE BAP.....	49
7.2.1	Evaluación de tratamientos de BAP, a los 15 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar.....	50
7.2.1.1	Análisis de Número de Brotes a los 15 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar.....	50
7.2.1.2	Variable longitud de brotes a los 15 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar.....	50
7.2.1.3	Variable número de hojas, a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar.....	56
7.2.2	Evaluación de tratamientos de BAP, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar.....	60
7.2.2.1	Variable Número de Brotes, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar.....	60
7.2.2.2	Variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar.....	65
7.2.2.3	Variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar.....	69
7.2.3	Análisis de variables en función del tiempo de tres variedades de caña de azúcar.....	73
7.2.3.1	Variable número de brotes a los 15 y 30 días de realizada la siembra.....	73
7.2.3.2	Variable longitud de brotes a los 15 y 30 días de realizada la siembra....	75
7.2.3.3	Variable número de hojas a los 15 y 30 días de realizada la siembra.....	78
8.	CONCLUSIONES.....	81
9.	RECOMENDACIONES.....	83
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	84
11.	APÉNDICE.....	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Agrupación de componentes, cantidades y volúmenes para la preparación de soluciones concentradas.....	38
Cuadro 2.	Volumen de soluciones concentradas para la preparación de un litro de medio de cultivo, para el establecimiento de los explantes <i>in vitro</i>	40
Cuadro 3.	Reguladores del crecimiento y niveles de BAP aplicados al medio de cultivo en las tres variedades de caña de azúcar.....	41
Cuadro 4.	Factores y niveles que se evaluaron en el estudio.....	45
Cuadro 5.	Descripción de tratamientos.....	45
Cuadro 6.	Tipo de transformación empleada en las variables de estudio en las tres variedades de caña de azúcar, a los 15 y 30 días después de la siembra.....	47
Cuadro 7.	Análisis de varianza para la variable número de brotes, a los 15 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$), CENGICAÑA 2003.....	50
Cuadro 8.	Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según el factor variedad, para la variable número de brotes.....	51
Cuadro 9.	Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según el factor nivel de BAP, para la variable número de brotes.....	52
Cuadro 10.	Análisis de varianza para la variable longitud de brotes, a los 15 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \text{Log}(Y+1)$), CENGICAÑA 2003..	53
Cuadro 11.	Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP para la variable longitud de brotes.....	54
Cuadro 12.	Análisis de varianza para la variable número de hojas, a los 15 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$), CENGICAÑA 2003.....	57
Cuadro 13.	Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP para la variable número de hojas.....	58

Cuadro 14.	Análisis de varianza para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$)}, CENGICAÑA 2003... 61
Cuadro 15.	Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP, para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra.... 62
Cuadro 16.	Análisis de varianza para la variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \text{Log}(Y+1)$)}, CENGICAÑA 2003.. 65
Cuadro 17.	Resumen de la variable longitud de brotes según la interacción variedad x BAP, a los 30 días después de la siembra..... 67
Cuadro 18.	Análisis de varianza para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$)}, CENGICAÑA 2003..... 69
Cuadro 19.	Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra..... 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura molecular de la 6-Bencilaminopurina..... 24
Figura 2.	Relativa concentración de auxinas-citocininas y los requerimientos típicos para el crecimiento y morfogénesis..... 26
Figura 3.	Estratificación de la zona cañera y localización del área de estudio..... 32
Figura 4.	Efecto de los tratamientos de BAP en el número de brotes, en la variedad SP 792233 y característica de tamaño de sus brotes, a los 15 días después de la siembra. CENGICAÑA, 2003. (1 = 0.00, 2 = 0.15, 3 = 0.30, 4 = 0.45, 5 = 0.60 y 6 = 0.75 mg/l de BAP)..... 51
Figura 5.	Efecto de los tratamientos de BAP en la longitud de los brotes, en la variedad PR 872080, a los 15 días después de la siembra. CENGICAÑA, 2003. (1 = 0.00, 2 = 0.15, 3 = 0.30, 4 = 0.45, 5 = 0.60 y 6 = 0.75 mg/l de BAP)..... 55

Figura 6.	Efecto de los tratamientos de BAP en la variedad CP 722086, se observa la brotación, la longitud de los brotes y las hojas diferenciadas, a los 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003. (1= 0.00 mg/l, 2 = 0.15 mg/l, 3 = 0.30 mg/l, 4 = 0.45 mg/l, 5 = 0.60 mg/l y 6 = 0.75 mg/l de BAP).....	64
Figura 7.	Promedio de brotes a los 15 y 30 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar, CENGICAÑA, 2003.....	73
Figura 8.	Efecto de la bencilaminopurina en la inducción de brotes en tres variedades de caña de azúcar a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.....	75
Figura 9.	Longitud brotes de tres variedades de caña de azúcar CP 722086, SP 792233 y PR 872080 a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.....	76
Figura 10.	Efecto de la bencilaminopurina en la longitud de brotes en tres variedades de caña de azúcar a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.....	77
Figura 11.	Número de hojas por brotes de tres variedades de caña de azúcar CP 722086, SP 792233 y PR 872080 a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.....	79
Figura 12.	Efecto de la bencilaminopurina en el número de hojas por brotes en tres variedades de caña de azúcar a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.....	80

APÉNDICE

Cuadro. 20. A	Equipo y cristalería usados para la realización del estudio.....	88
Cuadro. 21. A	Reactivos e insumos utilizados para la realización del cultivo <i>in vitro</i> de tres variedades de caña de azúcar.....	88

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abcísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG₃	Ácido giberélico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
ATP	Adenosin trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BAP	Bencilaminopurina
CaCl₂ · 2H₂O	Dicloruro de calcio dihidratado
CENGICAÑA	Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar
°C	Grados centígrados
cc	Centímetros cúbicos
cm²	Centímetros cuadrados
CoCl₂ · 6H₂O	Dicloruro de cobalto hexahidratado
CP	Canal Point
C.V.	Coefficiente de variación
CuSO₄ · 5H₂O	Sulfato de cobre pentahidratado
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
DCA	Diseño completamente al azar
DDT	Citiotreitol
EDTA	Ácido etilendinitrilo tetracético sal disodio, dihidratada
EtOH	Etanol
°F	Grados fahrenheit
FeSO₄ · 7H₂O	Sulfato de hierro heptahidratado
g/l	Gramos por litro
Ha	Hectárea
H₃BO₃	Ácido bórico
HCl	Ácido clorhídrico
IGM	Instituto Geográfico Militar
KH₂PO₄	Dihidrógeno fosfato de potasio
KI	Yoduro de potasio
KNO₃	Nitrato de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
Lx	Lux
MARN	Ácido ribonucleico mensajero
MgSO₄ · 7H₂O	Sulfato de magnesio heptahidratado
Mg	Miligramos
mg/l	Miligramos por litro
ml	Mililitros
MM	Micromolar
MnSO₄ · 4H₂O	Sulfato de maganeso tetrahidratado
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)
Msnm	Metros sobre el nivel del mar

NaMoO₄ · 2H₂O	Molibdato de sodio dihidratado
NaOH	Hidróxido de sodio
NH₄NO₃	Nitrato de amonio
PCNB	Pentacloro nitrobencono
PH	Potencial de hidrógeno
Ppm	Partes por millón
PR	Puerto Rico
PVP	Polivinilpirrolidona
SP	Saul Pablo
Ton/ha	Tonelada por hectáreas
ug/ml	Microgramo por mililitro
UI	Microlitros
v/v	Volumen sobre volumen
W/m²	Watts por metro cuadrado
ZnSO₄ · 7H₂O	Sulfato de zinc heptahidratado
%	Por ciento

EFFECTO DE LA 6-BENCILAMINOPURINA EN LA PROLIFERACIÓN DE BROTES *in vitro* DE TRES VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

6-BENCILAMINOPURINE EFFECT ON BUDS *in vitro* PROLIFERATION OF THREE VARIETIES OF SUGAR CANE (*Saccharum officinarum* L.)

RESUMEN

Con un área de 190,000 y potencial de 342,000 hectáreas, el cultivo de la caña de azúcar en Guatemala aumenta cada vez más la expansión y la introducción de nuevas variedades con carácter promisorio. En su proceso de industrialización genera 60,000 empleos directos y 250,000 de forma indirecta, en la zafra del 99/2000 representó el 4% del producto interno bruto y más del 20% de la producción agrícola. Éste incremento de áreas de cultivo y renovación de las ya establecidas requiere el uso de tecnologías definidas.

Para el presente año, en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICANÑA), se realizan estudios de propagación de materiales promisorios que luego se distribuyen a las empresas productoras de caña, las cuales utilizan el material vegetal como fuente de semilla básica para la siembra o renovación de áreas de cultivo. Dentro del laboratorio se han identificado variedades de importancia como la CP 722086, SP 792233 y PR 872080 que presentan la dificultad de baja brotación al cultivo *in vitro*, el inconveniente es en la disminución en cantidad de plantas y en el aumento del tiempo para la entrega a los ingenios.

En el presente trabajo se evaluaron tres variedades de caña de azúcar CP 722086, SP 792233 y PR 872080, las cuales se encuentran en el banco de germoplasma vegetal del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, dicho germoplasma sirvió como fuente de material para la siembra en el laboratorio.

Se utilizó el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (1962), como agente inductor la 6-bencilaminopurina, es un regulador del crecimiento catalogado dentro del grupo de las citocininas, considerada en varios estudios por ser un compuesto muy activo en la proliferación de brotes en diversas especies vegetales. Se evaluó con 5 niveles a 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 y 0.75 mg/l más un testigo éste sin la aplicación de BAP. Cada tratamiento dentro del medio de cultivo fue suplementado con 0.01 mg/l de ácido indolacético como auxina, 0.1 mg/l de cinetina y 150 mg/l de

ácido cítrico como antioxidante. El tipo de explante utilizado consistió en el ápice meristemático de cada una de las variedades de caña de azúcar.

Para facilidades de manejo, el experimento se dividió en dos fases: Prueba de antioxidantes, en la cual se evaluaron tres antioxidantes la L-cisteína, polivinylpirrolidona y el ácido cítrico en una sola concentración 10 mg/l, 0.05 % y 150 mg/l. Siendo éste último el más adecuado el cual redujo considerablemente el efecto de la oxidación en las variedades de caña de azúcar. La SP 792233 presentó la mayor oxidación, como de mediano efecto oxidativo la CP 722086 y la PR 872080 fue la que presentó menor oxidación. En la Fase II, de multiplicación o evaluación de tratamientos de BAP, se evaluó el efecto de la 6-bencilaminopurina en las tres variedades de caña de azúcar a los 15 y 30 días después de la siembra.

Se utilizó un diseño completamente al azar, bifactorial 3X6 en arreglo combinatorio con 10 repeticiones. Las variables de estudio consistieron en el número de brotes, longitud de brotes y número de hojas. La información obtenida fue analizada por medio de SAS (Statistical Analysis System versión 6.12.01), se hizo los análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de separación de medias Tukey al 5% para cada variable. Para el número de brotes y de hojas se hizo necesario la transformación de los datos con $Y' = \sqrt{Y+1}$, y para la longitud de brotes se utilizó $Y' = \text{Log}(Y+1)$.

Se observó que la variedad PR 872080, presentó el mayor número de brotes a los 15 y 30 días después de la siembra con 10.04 y 17.92 brotes por explante. Fue la que presentó la mayor longitud de brotes, pero en la producción de hojas se determinó intermedia con 4.06 y 4.50 hojas/brote. La variedad SP 792233 con 5.49 y 13.93 brotes/explante fue intermedia, a la vez fue la que presentó un tamaño de brote de 1.37 y 1.65 cm siendo el más pequeño de todo el estudio al igual que en el número de hojas con 3.98 a 4.46. Con una menor respuesta en el número de brotes la variedad CP 722086 con 5.83 y 9.79 pero intermedia en la longitud con 1.56 y 2.17 cm/brote, y con el mayor número de hojas diferenciadas del resto de variedades con 4.19 a 4.78 hojas/brote.

El nivel 0.75 mg/l de BAP, presentó el mayor número de brotes/explante a los 15 y 30 días con 8.95 y 20.43, pero a la vez con la aplicación de BAP en el medio de cultivo existió una disminución en la longitud y en la diferenciación de hojas. El testigo (0.00 mg/l de BAP), fue constante 4.55 y 4.60 brotes/explante y con la mayor longitud en las tres variedades de caña.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala, actualmente ocupa un área de 190,000 hectáreas (zafra 1999/2000) de un área potencial de 342,000 hectáreas (26). Por lo consiguiente, en dicha región cañera en el año de 1,979 se sembraron 40 variedades, en la zafra 1992-93, 66 variedades y en la zafra 1995-96 en un área de 83,958 hectáreas se cultivaron 27 variedades (26). La agroindustria de la caña se ha caracterizado por incrementar el área de cultivo. Razón por la cual su industrialización provee alrededor de 60,000 empleos directos y aproximadamente 250,000 de forma indirecta, además en la zafra 1999/2000 representó el 4% del producto interno bruto (PIB) y más del 20% de la producción agrícola, con un 23% del total de las divisas generadas por los productos tradicionales, según datos del banco de Guatemala de enero a octubre del 2,001 el azúcar aportó US\$ 236.60 millones contribuyendo positivamente a la economía del país.

El incremento de áreas de cultivo y renovación de las ya establecidas con lleva el uso de metodologías y técnicas definidas, por eso y a través de la riqueza de germoplasma de la caña de azúcar, se ha logrado la selección de variedades que satisfagan las necesidades agrícolas e industriales en un rango geográfico determinado y en diversas condiciones ambientales. La rentabilidad económica que presenten las variedades depende del grado de resistencia al ataque de microorganismos patógenos, su adaptabilidad a condiciones adversas, a sus altos rendimientos en la producción de azúcar y características agronómicas deseables de cultivo.

Se contempló a las variedades CP 722086, SP 792233 y PR 872080 dentro de un programa de propagación masiva de plántulas y para ello se recurrió al uso de tecnologías modernas. El Cultivo de Tejidos Vegetales es una alternativa a esta inquietud, debido a que por medio de esta técnica se puede obtener una propagación acelerada, a gran escala, en espacio y tiempo reducidos para obtener plántulas en cualquier época del año, intercambio de germoplasma de país a país, como también lo relevante la obtención de plantas libres de plagas y agentes infecciosos, garantizando de tal manera la calidad y sanidad de los materiales de caña de azúcar. La técnica permite la manipulación de plántulas con la finalidad de control, mejoramiento y propagación en corto tiempo de las variedades para obtener semillas que garanticen una adecuada producción del cultivo de la caña de azúcar.

Previo a lo anterior, se hizo necesario evaluar una metodología que permitió la propagación adecuada de las tres variedades de caña de azúcar con el uso de dicha técnica de cultivo de tejidos. En el presente trabajo, se evaluó el efecto que produce la 6-Bencilaminopurina en la proliferación de brotes, en cinco niveles más un testigo en la variedad CP 722086, SP 792233 y PR 872080, para lo cual se empleó un diseño estadístico completamente al azar, con seis tratamientos y 10 repeticiones analizándose cada variedad por separado a los 15 y 30 días después de la siembra.

Este estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), ubicado en la finca Camantulul, Santa Lucia Cotzumalguapa.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En la planicie costera del país, la agroindustria azucarera guatemalteca se ha desarrollado, en la cual se produce el 99.5% del total de caña del país, incrementándose áreas nuevas de cultivo y renovando otras ya establecidas con variedades que fueron seleccionadas en base a características agronómicas deseables, con alto rendimiento de azúcar, resistencia a plagas y agentes infecciosos y de importancia económica, entre estas variedades sobresalen la CP 722086, SP 792233 y PR 872080. La propagación de la caña de azúcar se realiza en forma vegetativa por medio de esquejes, en paquetes de 110 yemas para 10 metros lineales de la cual se obtiene una tasa de multiplicación de 1:10. Dicha tasa es baja y para obtener semilla se requiere de un tiempo considerable. Otra práctica de propagación es el uso de plántulas provenientes de yemas extraídas, y como lo indica Viveros y Cassalet (1994) (46), esta técnica posee una tasa de multiplicación de 1:140, haciéndola efectiva para establecer semilleros de caña como una opción del método convencional, pero las tasas de multiplicación van a depender de la variedad y el distanciamiento de siembra.

Estos dos tipos de propagación asexual de la caña de azúcar presentan el inconveniente de diseminar agentes infecciosos y plagas a las nuevas plantaciones lo que repercute en elevar los costos de producción para su control (28), otra de las limitantes es la baja tasa de multiplicación para obtener semilla lo cual hace que el proceso de siembra sea lento.

El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), realiza estudios para encontrar alternativas de solución a las limitantes de la propagación tradicional. Se realizan evaluaciones a través del uso de la Biotecnología Vegetal, como es la técnica del Cultivo de Tejidos con la finalidad de obtener plántulas de calidad fitosanitarias, con una multiplicación masiva en menor tiempo y con características agronómicas deseables. En estudios de micropropagación se ha establecido que las variedades CP 722086, SP 792233 y PR 872080 presentan diferentes grados de dificultad y recalcitrantes en cuanto su adaptación y multiplicación, la limitante de mayor envergadura es la baja proliferación de brotes (macollamiento), lo cual repercute en la tasa de multiplicación de plántulas, y que por tal razón las cantidades y tiempo de entrega de las mismas afecta a los diferentes ingenios azucareros que las utilizan como semilleros básicos para siembra.

En micropropagación, se ha demostrado que el uso de reguladores del crecimiento en particular las citocininas, inducen la proliferación de brotes, por tal razón se planteó la presente investigación en la cual se evaluó el efecto de la Bencilaminopurina para determinar la inducción a la mayor proliferación de brotes y así contribuir a una optimización de semillas de alta calidad y libres de plagas y agentes infecciosos en las variedades CP 722086, SP 792233 y PR 872080.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Marco conceptual

3.1.1 *El cultivo de la caña de azúcar*

El ciclo de cultivo de la Caña de Azúcar usualmente comprende un período de 12 a 14 años; lo que presenta un largo período de tiempo antes que una nueva variedad pueda ser comercialmente sembrada. La agroindustria del azúcar podría, en el futuro, afrontar serios problemas de reducción en el rendimiento que provoca el deterioro de las variedades ya existentes.

Este cultivo es propagado de manera general en forma vegetativa. La edad óptima de multiplicación de semilla-estaca en este cultivo está alrededor de 8-10 meses de edad, pues en este período se obtiene la mejor calidad de semilla para siembra, ya que los tallos maduros y viejos son inapropiados por lo inactivo de sus yemas (25).

De acuerdo con Orozco, et al. (1995) (25), en Guatemala, la caña de azúcar se propaga tradicionalmente por medio de esquejes, en paquetes de 110 yemas para 10 metros lineales; con una tasa de multiplicación de 1:10. Actualmente está en práctica el uso de plántulas provenientes de yemas extraídas, que de acuerdo con Viveros y Cassalett (1994) (46), reportan una proporción de 1:140 como tasa de multiplicación. Esta tasa es baja si se pretende obtener suficiente semilla de variedades promisorias para establecer pruebas de molienda (14). La multiplicación por el método tradicional es relativamente bajo, además presenta riesgos de incremento de enfermedades transmitidas por medios mecánicos. Otro aspecto son las enfermedades sistemáticas que están latentes frecuentemente en el material vegetal, por lo que al transportar semillas-estacas infectadas, de un país a otro, pueden éstas ser llevadas a diferentes partes del mundo, como lo es el intercambio de germoplasma vegetal.

Se estima que alrededor de 30,000-40,000 yemas vegetativas “estacas” de una determinada variedad son necesarias para plantar una hectárea con el fin de realizar pruebas de una nueva variedad y con la ayuda de la técnica de Cultivo de Tejidos estos problemas pueden ser resueltos. De acuerdo con Barva, et. al. (3), en nueve meses y medio, es posible producir suficiente material vegetal proveniente de un meristemo, como para plantar una hectárea, esto

usando propagación masiva por cultivo de tejidos. Comparado con los métodos convencionales, donde si la semilla estaca posee tres a cuatro yemas y cada yema produce un tallo con aproximadamente nueve yemas cada uno de estos producen aproximadamente 32 yemas a los nueve meses.

Para desarrollar un sistema de micropropagación asexual en caña de azúcar, se deben establecer los requerimientos nutricionales, hormonales además entenderse la producción de fenoles de cada una de las variedades a micropropagar (3).

3.1.1.1 Clasificación taxonómica del Cultivo

Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsidae
Subclase:	Commelinidae
Orden:	Cyperales
Familia:	Poaceae
Subfamilia:	Chloridoideae
Género:	<i>Saccharum</i>
Especie:	<i>S. officinarum</i> (10).

3.1.1.2 Descripción general del cultivo

La distribución del cultivo de la caña de azúcar se encuentra generalmente en su mayoría en las regiones tropicales del mundo.

A. Morfología

Orozco, et al. (25), menciona que Blackburn (1985), cita a Barber (1918) y Jeswiet (1925), como los pioneros en la morfología de la caña de azúcar, luego en 1939, Artshcwager propuso el primer descriptor botánico que en 1948, fue mejorado tomando en cuenta las características vegetativas de formas silvestres de *Saccharum*. Finalmente Artshcwager y Brandes en 1958, lo completaron con estudios acerca del origen características y descripciones de clones representativos de *Saccharum officinarum*.

a. El tallo

El tallo también conocido como una caña o culmo, está formado por los entrenudos que se encuentran separados por los nudos. La expresión de las características del tallo depende de los factores genéticos ambientales y la interacción de ambos. La capacidad de macollamiento y el hábito de crecimiento del tallo dependen principalmente de factores genéticos (25).

i. Entrenudo

El diámetro, color, forma y longitud del entrenudo son características varietales, que también pueden ser influenciados particularmente por la luz y disponibilidad de nitrógeno (Purseglove, 1972) (33). El color del entrenudo el cual varía en su expresión y penetrancia; genéticamente es debido a la presencia de antocianinas rojas y azules en células epidermales y clorofila verde en tejidos más profundos. Cuando ambos están ausentes el color es amarillo. Este carácter también puede ser modificado por efectos de la luz. Según Amaya, et. al. (1995) (2), la longitud del entrenudo es influenciada en gran medida por las condiciones edafoclimáticas y por el manejo agronómico. Blackburn (1985), citado por Purseglove, 1972 (33), indica que la longitud y diámetro del entrenudo son afectados principalmente por los factores nutricionales, temperatura y disponibilidad de agua. Por esta razón el tallo podría mostrar entrenudos cortos y delgados en el tercio medio reflejando crecimiento retardado durante una época seca.

ii. Nudo

El nudo es la base de la vaina y lámina foliar en el cual se desarrollan además las yemas y hojas, está constituido por el anillo de crecimiento la banda de raíces, la cicatriz foliar, el nudo en sí, la yema y el anillo ceroso. La banda o anillo ceroso es una capa que se observa en la parte inferior del nudo sobre el entrenudo; su intensidad es un carácter varietal (33).

De las partes del tallo, a la yema se le asigna la mayor importancia por ser el origen de nuevas plantas. Las partes más importantes de las yemas son las alas que se localizan a los lados o en la parte superior, el poro germinativo el ápice en la parte superior el cual es una prolongación de la estructura de la yema. La parte visible de la yema es una escama que en algunos clones está cubierta totalmente de pelos en otros solamente en las alas y pocas son libre de pelos.

Según Orozco, et al. (25), Jeswiet (1916), citado por Moore (1987), con base en esta

característica identifica 32 grupos de vellosidad localizados en la parte anterior y posterior de la yema, los cuales son importantes en la descripción botánica.

La presencia ocasional de más de una yema en el nudo se reporta como una anomalía fisiológica. Las características como forma, tamaño, color y vellosidad de la yema pueden no diferir dentro de una misma variedad. Se describen 8 diferentes modalidades en la forma de la yema las cuales fueron agrupadas por Skinner (1972), en 3 formas: redonda, ovalada y puntuda. De acuerdo con Artschwager y Brandes (1958), citado por Orozco, et al. (25), las formas ovaladas son las más comunes, la localización de la yema y el desarrollo alcanzado por el ápice a nivel del anillo de crecimiento es también un carácter clonal.

b. La hoja

Cada hoja consiste de dos partes: lámina foliar y vaina.

i. Lámina foliar

Las hojas están adheridas al tallo a través de la base de los nudos, alternamente en forma dística al tallo, se reporta que el tamaño y forma de crecimiento de las hojas en la planta varían considerablemente. La longitud y el ancho de lámina foliar dependen de las variedades; por lo que se sugiere el ancho de la lámina foliar o la tasa del ancho y largo como un carácter más estable. Por otro lado el crecimiento de las hojas está determinado por el tamaño de la hoja en sí y la dureza de la nervadura central. El color de las hojas es un carácter clonal que puede variar entre verde claro a oscuro y es menos frecuente encontrar variedades con colores púrpura o verde púrpura (25).

ii. Cuello

De acuerdo con Artschwager (1951), citado por Orozco., et al. (25), el cuello es la unión de la lámina foliar y la vaina en sus extremos, y se encarga del movimiento de la lámina foliar. La superficie exterior está formada por dos áreas generalmente triangulares que difieren de la lámina foliar en el color y estructura interna. Como regla la forma del cuello es un carácter clonal, aunque pueden ocurrir variaciones en un mismo tallo y entre los dos cuellos de una misma hoja. Las formas reconocidas del cuello son rectangulares deltoide y ligular.

iii. Vaina

La pubescencia o afate, generalmente mayor en la vaina, de la hoja que en la lámina foliar al nivel de la lígula, es un carácter efectivo en la diferenciación clonal. La presencia de afate sobre la superficie de la vaina en cantidad y longitud puede diferir conforme a la variedad. La lámina foliar envejece juntamente con la vaina, como característica varietal estos pueden o no adherirse al tallo, también se reporta que la intensidad con que se adhieren las vainas al tallo difiere con las variedades (25).

3.1.2 Micropropagación

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos a la regeneración y propagación comercial de las plantas enteras, es un desarrollo más reciente que se ha convertido en una alternativa importante de los métodos convencionales de propagación, en una amplia gama de especies de plantas (16). Hartmann y Kester en su libro sobre Propagación de Plantas, parecen haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*.

Cuando se considera que la mayoría de las plantas que se propagan mediante el cultivo aséptico, se originan generalmente en pequeños esquejes, se puede apreciar rápidamente que no hay nada fundamentalmente nuevo acerca de la multiplicación de las plantas por medio del cultivo de tejidos (16). La micropropagación, originalmente se definió como “Cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (16).

3.1.2.1 Aplicaciones del Cultivo de Tejidos

Las aplicaciones del cultivo de tejidos son numerosas y diferentes. Las posibilidades en agricultura podrían resumirse en los siguientes aspectos: Propagación de plantas, obtención de plantas libres de patógenos, mejoramiento genético de los cultivos y conservación e intercambio de germoplasma (24).

Se hace necesario recalcar que, para la aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo *in vitro* debe de lograr como producto final la regeneración de plantas enteras.

3.1.2.2 Fases de la Micropropagación

Existen tres pasos importantes, que deben tomarse en cuenta en la micropropagación, según lo propuesto por Murashige en 1974 (24).

A. Establecimiento o asepsia del Cultivo

En esta etapa es cuando se inoculan los explantes al medio de cultivo artificial, los cuales pueden provocar la proliferación de microorganismos en donde pueden crecer y desarrollarse, compitiendo con el cultivo, y a la vez destruyendo al explante, es por eso que es necesario que todos los explantes deben estar debidamente limpios y desinfectados.

B. Multiplicación

En ésta etapa sucede la formación de nuevas células por división, o por aumento en tamaño, está influenciada por las condiciones *in vitro* y la ganancia en peso seco da como resultado la diferenciación de novo. También existe la capacidad del cultivo y de los medios inductores para que puedan ser divididos y transferidos a nuevos medios de cultivos para seguir la secuencia de su multiplicación (24).

C. Enraizamiento y transplante

Esta consiste en el endurecimiento del cultivo para que pueda adaptarse a las condiciones fuera del laboratorio, para que sé de esta etapa, se debe trasladar el cultivo a otro medio reduciendo en un 50% las sales inorgánicas como a la vez realizar cambios en el balance hormonal, es decir, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas, esto con la finalidad de que exista una mayor proliferación de raíces para el sostenimiento de la planta. El período de endurecimiento o aclimatación en la cual la planta deberá colocarse en condiciones normales para su desarrollo total. Para lograr ésta fase se deberá lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que pudiera quedar en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas a las cuales se le abrirán agujeros para aclimatarlas poco a poco a su nuevo hábitat.

3.1.2.3 Factores que influyen en la Micropropagación

A. Medio de Cultivo

a. Agua

Los medios de cultivo de tejidos están constituidos en su mayor parte por agua; por lo tanto, es necesario utilizar agua de intercambio iónico o agua destilada, ya que el agua natural incluye algunas sustancias que pueden causar influencia negativa para el crecimiento de las plantas “in vitro” (41).

b. Componentes Inorgánicos

Los componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos elementos, aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento (41).

Nitrógeno

El nitrógeno es componente de aminoácidos (proteínas), vitaminas y ácidos nucleicos. Mientras la planta está en crecimiento activo, necesita gran cantidad de nitrógeno. Este se encuentra en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 , y en cantidad adecuada según la especie de planta.

Existen varias influencias del nitrógeno, en concentraciones altas, promueve el enraizamiento, mientras que, en concentraciones bajas, promueve el desarrollo de callo. Dos fenómenos semejantes son causados mediante la función de NH_4^+ (36).

Fósforo

El fósforo es uno de los elementos necesarios para el metabolismo de las plantas. Principalmente, es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía. Dentro de los medios de cultivo, las plantas lo absorben en forma de PO_4^{3-} .

Potasio

Existe relación entre el potasio iónico y la diferenciación de órganos.

Calcio

El Calcio es componente de la pared celular.

Magnesio

El magnesio es un componente importante de la molécula de clorofila.

Hierro

Para los vegetales, el hierro es importante, debido a que es un componente de la clorofila. Normalmente se da en forma de quelato (Fe-EDTA) en los medios de cultivo, ya que en otra forma se precipitaría (41).

Microelementos

Se adicionan manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y boro (B) a los medios de cultivo como microelementos.

c. Componentes Orgánicos

Vitaminas

Según la especie de planta, así se adiciona tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6) y ácido nicotínico, generalmente para el cultivo de la caña de azúcar es indispensable agregar la tiamina al medio de cultivo (29, 31,40).

Mio-inositol

Se sabe que el agua de coco incluye componentes que promueven la producción de células u órganos, y la diferenciación de las mismas. El *mio*-inositol es uno de estos componentes.

Aminoácidos

Acerca de la función de los aminoácidos, se sabe que estos promueven la producción y diferenciación de células y tejidos. Sin embargo, algunas veces pueden ocurrir inhibiciones en el crecimiento de las vitroplantas cuando se adiciona uno solo al medio de cultivo. En tal caso, se deben incluir combinaciones de varias clases para que actúen conjuntamente.

d. Componentes naturales

Los más utilizados son la pulpa de plátano, agua de coco, emulsión de pescado, jugo de naranja, extracto de malta, hidrolizado proteico (caseína), jugo de tomate, extracto de levadura, etc. En varios casos, éstos compuestos inducen diferenciación y la producción de células y tejidos eficazmente. Sin embargo, debido a que son componentes muy complejos, no son productos estables ni homogéneos, es mejor evitar su uso, sobre todo en trabajos de investigación (41,45).

e. Otros componentes

Fuente de Carbono

Originalmente, las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis. Sin embargo, las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan y aunque lo hagan producirán muy poco azúcar. A causa de esto, es necesario adicionar cierta cantidad de azúcar como fuente de energía. Por lo general esta cantidad varia entre 1 y 3% de sucrosa o glucosa que se agrega al medio de cultivo.

f. Agentes gelificantes para solidificar el medio de cultivo

Agar

Como un gelificante del medio de cultivo, el agar se utiliza más que otros agentes. Sin embargo, no se puede usar uno corriente como se ofrece en el mercado, ya que este es impuro y puede inhibir el crecimiento de las vitroplantas. Por consiguiente, se debe utilizar uno con alto grado de pureza. Normalmente, se adiciona entre 0.6 a 1% al medio de cultivo.

Phytigel

Es un gelificante que se aplica en porcentajes bajos que el agar, su precio en el mercado es elevado, pero de mayor pureza.

g. pH (potencial del ion hidrógeno)

La concentración del ion hidrógeno produce un efecto en la absorción iónica, en los medios de cultivo. La acidez y la alcalinidad extremas inhiben el crecimiento de las vitroplanta . Por lo general, se estabiliza el pH apropiado entre 5.4 a 6.0 con HCl y NaOH o KOH, según la especie de planta que se va a micropropagar (41).

h. Ambiente del cultivo

Las condiciones del ambiente influyen sobre varios aspectos del desarrollo de las vitroplantas, sobre todo en la diferenciación de órganos y formación de embriones adventicios; por lo tanto, es importante comprender las relaciones entre los factores del ambiente y su influencia sobre las plantas de cultivo "in vitro" (41, 45). Entre los cuales mencionamos la temperatura, la humedad relativa, el fotoperíodo, la intensidad lumínica, etc.

i. Contaminación

La contaminación provoca cuantiosas pérdidas en la micropropagación masiva y hace ineficiente económicamente algunos procesos. La contaminación en cultivo de tejidos puede originarse de dos fuentes:

Contaminación por microorganismos: Los contaminantes patógenos pueden ser *externos* o *internos*. Los primeros llamados exógenos, se encuentran en todas partes. Las esporas de estos organismos se mueven en las corrientes de aire, sobre partículas de polvo. Los microorganismos internos, sistémicos o endógenos, son los que se encuentran en el interior del tejido del explante, ya sea en espacios intercelulares o intracelulares.

Dentro de los microorganismos que se describen como contaminantes del cultivo de tejidos, se incluyen virus, bacterias, hongos (16, 23, 41). Sandoval, 1987, citado por López Morales (18), menciona que para obtener buenos resultados en la micropropagación, recomienda mantener controlada la contaminación en un rango de 10-20%.

3.1.2.4 Oxidación

La oxidación es una reacción originada por un grupo de sustancias aromáticas, llamadas *fenoles* que son derivados del benceno, las cuales son muy frecuentes en el reino vegetal en forma de éteres y glucósidos, algunos son de olor agradable, pero otros al oxidarse provocan un fenómeno en el que forman frecuentemente compuestos oscuros con propiedades antisépticas, que como consecuencia pueden impedir en el cultivo *in vitro* el desarrollo del propio explante.

La oxidación de los cultivos *in vitro* es causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con él oxígeno del frasco y producen coloraciones rojas, amarillas y en casos avanzados café oscuro. Éstos compuestos fenólicos son exudados por la herida del tejido dentro del medio, a la vez son atrapados por el agar y acumulados formando un área negra alrededor del explante, resultando en una inhibición del crecimiento (6, 9, 15).

Pocasangre, 1993, citado por López Morales (18), refiere que el color café característico de la oxidación, llamado ennegrecimiento del explante, se debe a que las enzimas monofenoloxidasas (tirasinasa y la polifenol oxidasa (catecoloxidasas) oxidan los fenoles dando como resultado quinonas.

El fenómeno de la oxidación se observa normalmente en explantes viejos después de cultivarlos durante un tiempo largo, formándose materia orgánica alrededor del explante y el medio

de cultivo se torna café oscuro. Algunas especies tienen una tendencia de oxidación desde el inicio del cultivo, ocurriendo necrosis o inhibición del crecimiento. La toxicidad por oxidación se cree que ocurre a través del algún complejo químico de fenol orgánico metabólico (15, 23).

Sandoval, 1987, citado por López Morales (18), indica que las principales fuentes de oxidación son el tipo de material que se utilice, ya que incluso dentro de una misma especie existen distintos grados de oxidación, y otra, es una defectuosa Desinfestación superficial del material que es transferido al laboratorio.

A. Antioxidantes

Muller L. & A. Krikorian (1985), citados por Cambara (6), indican que los antioxidantes son sustancias que se usan durante la preparación de los explantes o que se adicionan al medio para evitar o reducir la oxidación de ciertos compuesto, especialmente derivados de fenoles ó polifenoles, que pueden afectar el desarrollo de los explantes.

Lee, citado por López Morales (18), hace las siguientes propuestas para impedir el ennegrecimiento de los explantes:

- Utilizar Polivinilpirrolidona (PVP).
- Modificando el potencial redox, a través de agentes reductores o con menor disponibilidad de oxígeno.
- Inactivando las enzimas fenolasas.
- El control más efectivo, son los subcultivos frecuentes y la eliminación de tejidos que se encuentran casi muertos y por lo general se localizan en la base de los brotes.

Ken Okabe (23), sugiere los siguientes pasos para evitar el fenómeno de la oxidación:

a. Aplicar absorbente de materia orgánica metabólica

Carbón activo: Es común de aplicar al medio porque el mismo no es tóxico. Teóricamente se le puede aplicar en cualquier cantidad. Esta sustancia tiene la propiedad de absorber cualquier compuesto químico pero inhibe el funcionamiento de las fitohormonas. Por esta razón, normalmente se aplica dentro del rango de 0.6 a 10.0 g/l aplicándose antes de calibrar el pH, ya que lo aumenta.

Polivinilpirrolidona (PVP): La absorción de esta sustancia química es más limitada, debido a tanto complejo de fenol. La polyvinilpirrolidona tiene varios tamaños moleculares y se disuelve bien

en alcohol etílico, sin embargo, algunas veces inhibe el crecimiento. Además no se disuelve en el medio y no es común en el mercado. Generalmente se aplica en el rango de 0.1 a 1%.

b. Aplicar inhibidor de oxidación

Acido ascórbico (vitamina C) Esta vitamina inhibe la oxidación. Actúa reduciendo el complejo fenólico. Generalmente, se mezcla con varias vitaminas. Algunas veces se reduce la velocidad del crecimiento por mayor funcionamiento de antioxidación. Normalmente se aplica en el rango de 0.2 a 10 mg/l.

Hidroquinolona (8HQ hemisulfatado). Este reactivo inhibe eficientemente la oxidación por fenoles. Tiene características establecidas y una toxicidad leve. Sin embargo, algunas veces reacciona con iones de metal y causa precipitaciones de complejos metálicos. Se aplica en el rango de 10 a 100 mg/l.

L-cisteína. Es un aminoácido que es utilizado como un antioxidante en el cultivo de la caña. En una solución neutral o poco básico o alcalino se oxida a cistina por medio del aire, con una solución ácida no se oxida tal fácilmente. Se disuelve en agua, ácido acético, es insoluble en éter, acetona, benceno, carbón bisulfido (19, 20).

Según Cambara (6), se puede utilizar otros antioxidantes para prevenir la oxidación:

Acido cítrico: Es un ácido tricarboxílico muy común en plantas, especialmente frutos; es usado como antioxidante en la preparación de explantes y medios, es una de los compuestos claves del ciclo de Krebs (Ciclo de los ácidos).

Reactivo de Cleland: Es utilizado para retardar la oxidación, especialmente de grupos $-SH$: reduce disulfidos cuantitativamente, es sinónimo de Ciotreitól o DTT.

Ovalle, 1996 (29), afirma que es posible utilizar antioxidantes químicos pero no todos son efectivos, por ejemplo, el ácido ascórbico es conveniente utilizarlo por períodos cortos, porque muy rápidamente se vuelve un oxidante fuerte; o sumergir los explantes en soluciones de cisteína HCl.

3.1.2.5 Desinfestación de materiales vegetales

Según Ken Okabe (23), algunos materiales están cubiertos alrededor del meristemo por resinas donde no es efectivo el desinfectante. En estos casos solo se puede aislar un meristemo

hasta que se obtenga alguno que no este contaminado. Se puede modificar la forma de Desinfestación para que mejore la tasa de sobrevivencia como agregar:

Alcohol al 70% (30 segundos) más hipoclorito de sodio al 1% (10 minutos) ó hipoclorito de sodio al 3% más Tween 20 (5 minutos) y finalmente se enjuaga tres veces con agua esterilizada durante 5 minutos cada vez, ó

Alcohol al 70% (30 segundos) más 25 ppm de PCNB (Pentacloronitrobenceno) más 500 ppm de penicilina G (30 minutos) luego hipoclorito de sodio al 3% más Tween 20 (5 minutos), y pro último enjuague tres veces con agua esterilizada (5 minutos cada vez).

En lugar de hipoclorito de sodio al 3% se puede cambiar a hipoclorito de calcio al 7%. No es necesario utilizar siempre hipoclorito de sodio. El postratamiento de éstos materiales se puede hacer de la siguiente manera (Tanaka, et al. 1980) (23):

Soluc. descontaminación (postrat.)	mg/l	Microorganismo/controla
1) Ampicilina	500	Bacterias gram (+), <i>Erwinia spp.</i> , <i>agrobacterium spp.</i> y <i>Pseudomonas spp.</i>
2) Benomyl WP 50 p/p%	10	<i>Cercospora spp.</i> , <i>Verticillum spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> y <i>Botrytis</i> .
3) RTU PCNB (Pentacloronitrobenceno)	25	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>sclerotinia spp.</i>
4) Rifampicilina	10	Bacterias gram (+), <i>Xhantomonas spp.</i> <i>Erwinia spp.</i> , y <i>Pseudomonas spp.</i> Gram (-). <i>Clavibacter spp.</i> , <i>Streptomyces spp.</i>
5) TBZ (Thiabendazole 45%)	100	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Pennicillun spp.</i> , <i>Oidium spp.</i>
6) Vancomycin	50	Bacterias gram (+), <i>Erwinia spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> y Micoplasmas (37).

Se disuelve alternativamente los elementos en ocho ml de alcohol al 99% en un beaker esterilizado y se agregan 992 ml de agua esterilizada. Los elementos que no se disuelven se deben agitar suficientemente. El uso de esta solución es la siguiente:

Alcohol al 70% (30 segundos) hipoclorito de sodio al 1%* Tween 20 (10 minutos) se enjuaga con agua esterilizada (tres veces, cinco minutos) más la solución para descontaminación (30 minutos),

se agrega 1 ml en la superficie del medio conjuntamente con el tejido, cultivándose 10 días bajo oscuridad.

3.1.2.6 **Condiciones de laboratorio**

Perea (1988) (30), reporta que los factores físicos de los laboratorios deben tener en cuenta: la temperatura y la luz. El grado higrométrico del aire no tiene mucha importancia puesto que las plantas cultivadas en medio cerrado “*in vitro*” se encuentran en una atmósfera naturalmente saturada. El cuarto de cultivo debe ser climatizado con temperatura estable y con estantes sobre los cuales se coloca los cultivos que deberán ser sometidos a fotoperíodos para un buen desarrollo.

A. Temperatura: la caña de azúcar por ser una planta tropical se establece entre un rango de 25-30°C. Para el cultivo *in vitro*, es necesario programar la temperatura de acuerdo con los períodos de luz y oscuridad o constante. De igual manera se debe establecer la temperatura con las exigencias de la planta, climas cálidos o fríos.

Otro de los factores interesantes, es la temperatura mantenida en los recipientes cerrados, la cual es superior a la del cuarto climatizado con luz.

B. Iluminación: la luz es requerida para la fotosíntesis de los explantes verdes cultivados *in vitro*. Además la luz es indispensable para regular ciertos procesos morfológicos, considerándose tres factores importantes:

a. Fotoperíodo: las plantas requieren un fotoperíodo constante según sus necesidades fisiológicas; por lo tanto, se debe mantener un tiempo apropiado para cada especie de planta. Normalmente, las vitroplantas se colocan por 12 horas bajo iluminación, y luego el mismo tiempo bajo oscuridad durante un día.

b. Intensidad lumínica: bajo iluminación suficiente, las plantas crecen fuertes, con poca altura pero con hojas bien desarrolladas. Mientras tanto, con poca iluminación, crecen débiles, con hojas pequeñas y anormales (23). Sin embargo, no se recomienda una iluminación excesiva, puesto que emite mucho calor, lo cual es negativo para el crecimiento de las plantas. Normalmente, lo mejor es una iluminación entre 1,000 a 3,000 lux, según la especie vegetal.

c. Longitud de onda de luz: influye en la división celular y la diferenciación de órganos (23). En micropropagación la calidad del espectro de luz parece influenciar los procesos

morfogenéticos. Selbert (1978) considera que sobre callos de tabaco las radiaciones azules y violetas inducen la formación de brotes mientras que las radiaciones rojas inducen la rizogénesis. Generalmente las fuentes de luz utilizadas consisten en tubos fluorescentes caracterizados por sus curvas de emisión espectral.

C. Aireación: normalmente las plantas producen oxígeno a través de la asimilación de bióxido de carbono y realizan la fotosíntesis; las vitroplantas, debido a las condiciones en que se encuentran, no realizan eficientemente este proceso (23). Además, hay posibilidades de que se forme el gas etileno que inhibe la diferenciación y promueva la callosidad. Por consiguiente, es necesario que se mantenga oxígeno, lo cual se puede lograr sin cerrar herméticamente los recipientes de cultivo (41).

D. Procesos defectuosos en el laboratorio: López (18), indica que si algún procedimiento es realizado defectuosamente es probable que incida en consecuencias negativas en el cultivo de tejidos, como puede ser el caso de.

- Fallas en la esterilización del medio de cultivo e instrumentos de disección.
- Fallas en la Desinfestación superficial aplicada al material vegetal a trabajar.
- Fallas de condiciones asépticas de la cámara de transferencia.
- Fallas de refrigeración y/o ventilación en el cuarto de incubación.

E. Vitrificación: la vitrificación es un fenómeno fisiológico que puede causar serios daños en la fase de multiplicación, consiste en el aumento del potencial hídrico de las células que causa el enverdecimiento de los tejidos y los vuelve quebradizos. Este desorden, afecta la fotosíntesis y el intercambio de gases por las hojas y más tarde impide el establecimiento ex vitro de plantas micropropagadas (18).

3.1.3 Reguladores de crecimiento

Se reconoce actualmente que la mayor parte de la actividad fisiológica de las plantas, está regulada por un complejo de sustancias químicas llamadas hormonas (13). Este término fue acuñado por los especialistas en fisiología animal y a partir de allí han surgido confusiones considerables en cuanto a la terminología de las sustancias de crecimiento (45).

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos, que en pequeñas

cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico vegetal. Las hormonas de las plantas o fitohormonas, son reguladores producidos por las mismas plantas, que en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos de aquellas y por lo general se desplazan de un lugar de producción a un sitio de acción (45).

Las hormonas del crecimiento se definen como “sustancias que siendo producidas en una parte de un organismo son transferidas a otra y en ésta influyen un proceso fisiológico específico”.

En realidad es muy difícil definir el término hormona vegetal con toda precisión. Muchas sustancias del tipo hormonal pueden actuar en su lugar de síntesis, actúan al parecer de modo no específico o actúan a nivel genético como inductores o represores. A menudo se prefiere el término fitorregulador, refiriéndose a compuestos naturales o sintéticos que inducen respuestas en el crecimiento, desarrollo o metabolismo (5).

Para Hartman (16) las auxinas y citocininas son las más importantes para regular el crecimiento y la morfogénesis en el tejido de las plantas y en el cultivo de órganos, para ellas, reguladores sintéticos han sido descubiertos con una actividad biológica que iguala o excede la de las sustancias de crecimiento equivalentes. No hay alternativas químicas para las giberelinas naturales, las cuales son extraídas de hongos cultivados y se utilizan como reguladores exógenos.

Para Bidwell (5), las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, que actúan generalmente en áreas diferentes a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades.

El término hormona ha sido reservado para ciertos compuestos naturales que ocurren en las plantas como reguladores del crecimiento. Aunque el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y la Kinetina son reguladores del crecimiento las cuales no son considerados como hormonas.

3.1.3.1 Auxina

Thiman (39), define a las auxinas como sustancias orgánicas que promueven el crecimiento (aumento en volumen), a lo largo de eje longitudinal, en concentraciones aproximadas de 10^{-3}

Molar. Todos los compuestos que tienen actividad auxínica poseen hidrógeno y oxígeno en proporciones y disposiciones diferentes y algunos de ellos contienen, además, nitrógeno y cloro; tienen estructuras simples, pero la mayoría son complejos (47).

Las auxinas son sustancias que participan en la elongación y división celular. Las concentraciones recomendadas son de 0.1 a 10 mg/l. Dentro de las auxinas más utilizadas están el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA) y el 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), siendo el AIA una auxina natural (13,18).

Por lo general, en la preparación de un medio de cultivo se utiliza solamente un tipo de auxina ya que puede provocar la llamada **habitación de los tejidos *in vitro*** en la cual no se estimula el crecimiento de las plantas a las aplicaciones exógenas de éstas (18).

A. *Función de las auxinas en la formación de las raíces*

Se debe distinguir claramente entre el efecto de las auxinas sobre la formación de las raíces y su efecto sobre el alargamiento radicular. En general las concentraciones requeridas para el primero de éstos procesos son mucho mayores que para el segundo.

Un efecto importante de la auxina, que también implica división de células, es el de provocar la iniciación de raíces laterales y adventicias en la raíz y en el brote. Este efecto tiende a correlacionar el grado de ramificación del sistema radical con el grado de desarrollo de yemas de brote. Más aún, debido al transporte polar hacia abajo, la auxina tiende a acumularse justamente arriba de cualquier sitio dañado en el tallo o en el sistema radical. Esta acumulación estimula la iniciación de raíces adventicias en el lugar dañado, con lo que promueve la regeneración de las raíces perdidas y aumenta las probabilidades de supervivencia de las partes aéreas de una planta después que haya sufrido una lesión abajo o al nivel del suelo (13).

B. *Utilización de auxinas para estimular el Enraizamiento*

Uno de los mejores estimuladores del enraizamiento es la auxina AIB, tiene una actividad auxínica débil y los sistemas de enzimas destructores de auxinas, la destruyen en forma relativamente lenta. Un producto químico persistente resulta muy eficaz como estimulante de las raíces. Debido a que el AIB se desplaza muy poco, se retiene cerca del sitio de aplicación. Los reguladores del crecimiento que se desplazan con facilidad pueden causar efectos indeseables de

crecimiento en la planta propagada.

Otra auxina utilizada en la promoción de raíces es el ANA, este compuesto es más tóxico que el AIB y debe evitarse las concentraciones excesivas por el peligro de provocar daños a las plantas.

El AIB y el ANA resultan más efectivos en la inducción del enraizamiento que el AIA. El AIA es muy inestable en las plantas y se descompone rápidamente en soluciones no esterilizadas, aun cuando permanece activo en soluciones estériles durante varios meses. Los rayos fuertes del sol pueden destruir en 15 minutos una solución de 10 ppm de AIA. Las amidas de AIB y ANA son también agentes muy efectivos del enraizamiento. La forma amida del AIB es menos tóxica que el ANA y por tanto, puede utilizarse con mayor seguridad. El AIB produce un sistema de raíces fuertes y fibrosas, mientras que los ácidos fenoxiacéticos a menudo producen un sistema de raíces atrofiado y maltoso, compuesto de raíces dobladas y gruesas. Las sustancias promotoras del enraizamiento son a menudo más eficaces cuando se utilizan en combinación (45).

Las auxinas mas frecuentemente incorporadas a los medios para inducir enraizamiento son AIA (0.05-10 mg/l), ANA (0.05-1 mg/l), ó AIB (0.5-3 mg/l). Estos componentes pueden algunas veces ser tratados como alternativas, pero frecuentemente la formación de raíz es mucho mejor con una que con otra. El ANA por ejemplo, es superior al AIA y AIB para el enraizamiento de brotes de Olivo (17).

3.1.3.2 Citocinina

A. Concepto de Citocinina

Las citocininas son potentes factores del crecimiento para la diferenciación y son sustancias que regulan la división celular (4). Haberlandt (1913) encontró que los tejidos floemáticos difundían una o unas sustancias capaces de inducir la división celular de tejido parenquimatoso de patata. Skoog observó que en segmentos de tallo de *Nicotiana spp.*, que incluía corteza, vasos y médula no crecían en un medio simple y necesitaba añadirle una auxina para que hubiera alargamiento y proliferación de la médula, por otra parte, si se colocaba esta aislada y añadía auxina se observaba alargamiento de las células sin división de las mismas, pero cuando la médula se ponía en contacto con el tejido vascular, podía observarse de nuevo división celular (4).

El primer compuesto con las propiedades de la citocinina que se logró identificar fue la *cinetina*, aunque fue aislada a partir del DNA del esperma del arenque, ya que no se encuentra en forma natural en las plantas (4). La cual es considerada la primera citocinina que se descubrió y aislada por Skoog en Winscon. El DNA fue purificado en estado cristalino, una sustancia activa que fue identificada como 6-(furfurilamino)-purina y que se conoce con el nombre de *Kinetina* (9, 4,15).

Miller (1961) aisló una sustancia a partir de granos inmaduros de maíz que demostró poseer alta actividad sobre el proceso de división celular y que denominó como *zeatina*. Al año siguiente describió que se trataba de un derivado de la adenina N⁶ substituido (9).

La semejanza entre la estructuras de zeatina y Kinetina, así como de otras sustancia con actividad sobre la división celular, que se encuentra sin modificar en la naturaleza, tales como 6-(metilamino)-purina, 6-(dimetilamino)-purina o 6-(β^2 -isopentenilamino)-purina, ha hecho que todos estos compuestos se agrupen en una nueva categoría hormonal que recibe el nombre genético de *citocininas* (13).

B. Citocininas análogas sintéticas

Las citocininas naturales como la zeatina, el 2ip (isopenteniladenina) y la dimetilaminopurina, son usadas en la investigación, aunque no se emplean rutinariamente en los laboratorios comerciales por su costo, por fortuna, varios químicos análogos de las citocininas naturales, aparte de la cinetina, se ha preparado y probado que son altamente activos como las citocininas, están sustituidos por los derivados de 6-adenina, algunos otros compuestos estructuralmente poseen actividad citocinínica, como por ejemplo 4-alkylaminopteridinas y 6-bencilaminopurina y son reportados más activos que la cinetina (17, 41).

Entre la mayoría de citocininas sintéticas usadas en micropropagación están:

- Kinetina 6-furfurilaminopurina.
- BAP 6-bencilaminopurina o
- BA benciladenina.

Otras citocininas sintéticas (10):

- PBA 6-(bencilamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purina o
- SD 8339 N-benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)-adenina.

a. **Bencilaminopurina**

Dentro de las citocininas el **BAP (6-bencilaminopurina)**, se utiliza actualmente más que la Kinetina y la Zeatina, debido a que es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente a un precio razonable. Particularmente es efectiva en promover la morfogénesis, tiene su punto óptimo en cuanto a la concentración más utilizada de 0.1 a 2.0 mg/l. Siendo su peso molecular de 225.26 g/mol, su fórmula química $C_{12}N_{11}N_5$, el grado de pureza es de 99.9% y en la figura 1 se presenta su estructura molecular (15, 20, 32, 41).

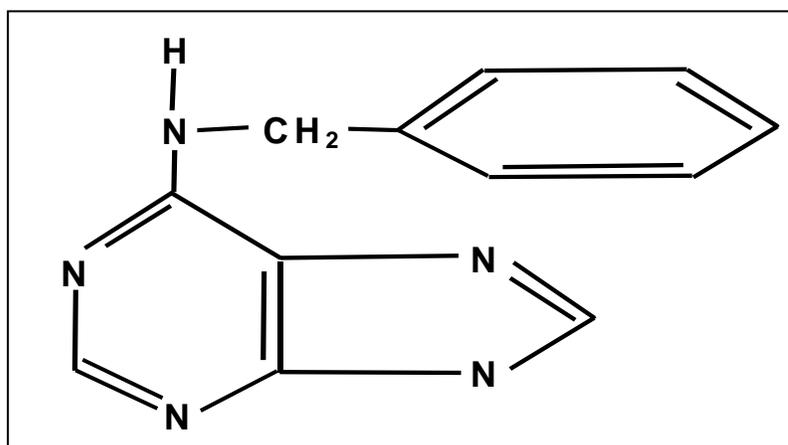


Figura 1. Estructura molecular de la 6-Bencilaminopurina.

C. **Lugares de síntesis de las Citocininas**

Ocurre en hojas jóvenes, y también en la zona meristemática, en semillas en germinación, flores y frutos. Los lugares donde más se les encuentra con abundancia, son los meristemas de raíz.

Las citocininas son producidas en las raíces, se sintetizan principalmente en los ápices radiculares y son transportados por el xilema al tallo y resto de la planta, aunque también se conducen a través del floema, este transporte puede ser de tanto de órgano a órgano como de raíz a tallo o viceversa (4, 9).

Según Pocasangre (32), altas concentraciones de citocininas (0.5-10 mg/l) inhiben o retrasan la formación de raíces, previenen el crecimiento de éstas y promueven el efecto de las auxinas en la iniciación de las raíces. Por tal razón, las citocininas son omitidas en la fase de enraizamiento de la micropropagación. Al utilizar seis miligramos por litro de BAP en micropropagación de plátano, observó la muerte de los explantes por una intoxicación por exceso de hormona (29). Esta intoxicación se puede dar, porque las citocininas, aceleran la síntesis de ADN, es decir, al aplicar una dosis demasiado alta, hay una desmesurada aceleración de su metabolismo por lo que la célula ya no es capaz de sintetizarla.

D. Mecanismo de acción

La citocinina promueve la acumulación, incluso la entrada de Ca a la célula, este va asociado a una proteína denominada Calmodulina. Dicho compuesto promueve la síntesis de proteínas.

Según Evans, et al. (1983), citado por Roca, (34), considera que el modo de acción de las citocininas es a través de la síntesis de proteínas específicas para el desencadenamiento de la mitosis. Dentro de la misma la Kinetina ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular, no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural y generalmente se reconoce como un artefacto.

La forma de acción de las citocininas en la planta es incierta. Parecen estar implicadas en el metabolismo del azúcar. La cinetina como la bencilaminopurina inducen a la aparición de nuevas clases de proteínas en las raíces intactas.

E. Efectos fisiológicos de las citocininas

Las citocininas se adicionan al medio para promover la división celular y diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos, promueven la embriogénesis somática, inhiben la formación de raíces. El éxito del tratamiento con citocininas, induce el crecimiento de muchos y pequeños brotes de cada explante, después de cuatro a seis semanas. La formación de brotes adventicios, ya sea directa del explante o indirectamente a través de la formación de callo, es regulado por la interacción entre auxinas y citocininas (18).

Las citocininas son, típicamente las hormonas de la división celular activando el proceso directamente (como efecto de la activación metabólica), a comparación de las otras hormonas que lo hacen de forma indirecta. Además determinan la dominancia apical en interacción con las auxinas. Los fenómenos estimulados con las citocininas son característicos de las plantas y tejidos jóvenes, por lo que parecen ser “factores de juvenilidad”, por lo que la deficiencia provoca senescencia.

F. Interacción auxina-citocinina

La formación de brotes inducida en callos, usualmente se utiliza niveles bajos de auxinas y elevados en citocininas en el medio de crecimiento. Se han descubierto, aspectos de diferenciación celular y organogénesis en cultivo de tejidos y órganos, controlados por una interacción entre concentraciones de auxinas y citocininas. El balance entre los dos tipos de reguladores que es usualmente requerido para iniciar el crecimiento de diferenciación en cultivo de tejidos, se muestra en la siguiente figura:

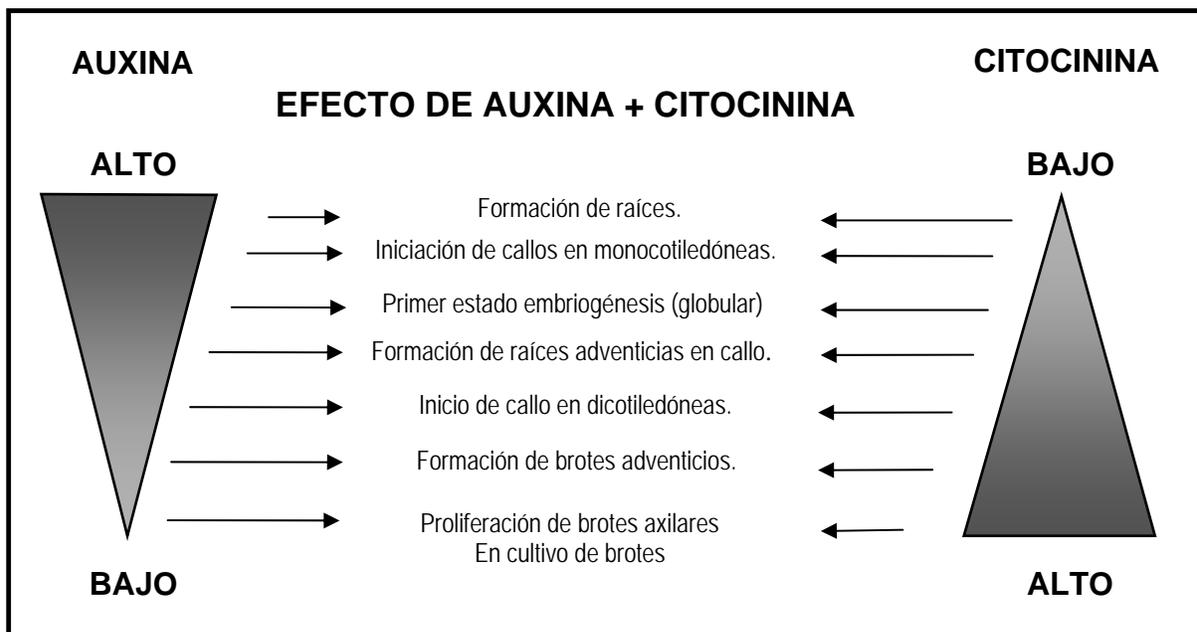


Figura 2. Relativa concentración de auxinas-citocininas y los requerimientos típicos para el crecimiento y morfogénesis.

Las proporciones de auxinas y citocininas no siempre producen el resultado típico descrito anteriormente, por ejemplo:

- La proliferación de brotes axilares en algunas especies es muy prometedora con la presencia de una auxina y citocinina.
- Para tejidos en monocotiledóneas frecuentemente se induce a la formación de callos por cultivo, con altos niveles de auxina, las citocininas no son esenciales.
- La organogénesis en monocotiledóneas es frecuentemente prometedora por la transferencia del cultivo a un medio sin auxina, o por la concentración reducida de una alta actividad auxinica, semejante al 2,4-D o reemplazar el 2,4-D por otra auxina (15).

3.1.4 Cultivo de tejidos en caña de azúcar

En caña de azúcar se han realizado varios trabajos de mejoramiento genético con la técnica del cultivo *in vitro* y esta especie es ideal para este objetivo; pero a medida que se aumentan los subcultivos, se pierden cromosomas los cuales de 82 en promedio en la R0, descienden a 30 en la R8; la R2 es recomendado como la mejor para la regeneración (31).

Estudios en los cuales se evalúa la variabilidad producida por los cultivos es un poco contradictoria (31). Feldemann (1984) analizó de 10 a 16 sistemas enzimáticos en plantas obtenidas de callos de 13 variedades concluyendo que la caña de azúcar es una planta estable en los cultivos *in vitro*, los cambios producidos se deben al rejuvenecimiento y a la sanidad de las plantas regeneradas.

Se ha encontrado que la inestabilidad en los cultivos *in vitro* esta influenciado por los genotipos y las auxinas, como también señalan que se deben de seleccionar los genotipos que se sometan a esta técnica según la estabilidad de su cariotipo (31).

Nickell, (1961), citado por Hurtado (17), inicio en Hawaii los primeros trabajos de investigación, con esta especie, utilizando la metodología de cultivo de tejidos; ésta técnica actualmente complementa al sistema tradicional de selección; permite manipular genéticamente los materiales aptos para seleccionar, a partir de poblaciones celulares con el propósito de obtener cultivares con características fenotipicas deseables.

Los primeros cultivos asépticos de caña de azúcar se elaboraron con el medio White al que se le agregó agua de coco y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (19). En 1964 Nickell desarrolló la técnica del cultivo de tejidos en la caña de azúcar obteniendo masas callosas a partir de trozos de parénquima (44).

De acuerdo a lo expuesto por A. Dookum, et al. (14), el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar ha ganado importancia en muchos países productores de este cultivo, a la vez esta siendo adoptado para la micropropagación de esta especie como una de sus técnicas más importantes.

Hendre (1983), citado por Cambara, (6), indica que en la India se ha demostrado que es posible producir alrededor de 260,000 plantas provenientes de un solo meristemo apical en un período de 4 meses y aproximadamente 200,000 plantulas podrían ser enraizadas a partir de ese explante en dos meses más. Este número podría ser suficiente para plantar 10 hectáreas de prueba en el campo.

En Hawaii, Comstock (1988), ha reportado que alrededor de 20,000 plantulas podrían ser multiplicadas semanalmente a partir de plantas regeneradas de puntas de brotes conteniendo el meristema apical (14).

La propagación *in vitro* ha sido ampliamente utilizada, no solamente por la rápida producción de material para plantar nuevas variedades, si no para obtener material limpio. Otros investigadores citados por Dookun & Autrey (1995) (14), sugieren que es el método indicado para obtener material limpio, conservar recursos genéticos *in vitro* y él más seguro y preferido para el intercambio de variedades entre países, debido a que posee un mínimo riesgo de trasladar las enfermedades.

3.1.4.1 Micropropagación

El coeficiente de multiplicación de la caña de azúcar es bajo y por ello la micropropagación *in vitro* de este cultivo es útil. Esta técnica se aplica en los bancos de germoplasma, en el intercambio de material genético, en la producción de plántulas para seleccionar, en la producción comercial de semillas, y en saneamiento de clones para eliminar *Ustilago* sp., el mosaico y la enfermedad del retoño achaparrado (Lee, 1986) (31).

En la micropropagación se emplean meristemas apicales axilares, aunque se prefieren los primeros porque están libres de contaminación y presentan menos problemas con la fenolización (31). La contribución más importante de la micropropagación en los programas de mejoramiento genético es manipular en forma masiva un genotipo seleccionado, conservando las características agronómicas del mismo, en donde la posibilidad de límite de producción es considerablemente más elevada que por los métodos convencionales.

El método de propagación *in vitro* tiene un efecto positivo en la producción rápida de caña de azúcar, por lo que puede ser una alternativa para los métodos tradicionales. Se ha demostrado que las variedades micropropagadas son de mejores características agroproductivas que las sembradas agámicamente, principalmente en el número de tallos y el volumen de caña aprovechable. Además se ha demostrado que el tiempo seleccionado y multiplicando una nueva variedad de caña puede ser reducido a siete años usando la propagación clonal; es decir la mitad del tiempo que emplean los métodos tradicionales (31).

En general las etapas metodológicas que comprende la micropropagación de la caña de azúcar son las propuestas por Murashige:

- Etapa de establecimiento, asepsia del cultivo (Iniciación).
- Inducción de la brotación, multiplicación de propágulos.
- Enraizamiento y desarrollo de plántulas.

3.1.4.2 Medios de cultivo en caña de azúcar

En base a lo expuesto por Dookun, et al. (1995) (14), el medio más utilizado para las etapas metodológicas de iniciación, brotación y regeneración, consiste en las sales de Murashige & Skoog (1962) con ligeras modificaciones en macroelementos, vitaminas y fitohormonas también con algunas mejoras actuales como: el uso de medio líquido para la etapa de iniciación más un antioxidante para reducir la fenolización, como Polivinilpirrolidone (PVP) o ácido cítrico, a la vez mencionada Lee (1987) y Nagai (1988) citados por Nand L. (22), el carbón activado se puede agregar al medio sólido en la etapa de iniciación. El pH del medio debe estar comprendido entre 5.6-5.8; la esterilización se ejecuta a 110°C por un espacio de tiempo de 15 minutos a 15 libras/pulgadas² equivalente a 1.2 atmósferas/cm² de presión.

3.1.4.3 Técnicas de cultivo de tejidos en caña de azúcar

De acuerdo con Muller, citado por Cambara, (6), el término cultivo de tejidos es usado frecuentemente como generalización para describir cualquier tipo de cultivo aséptico de células, tejidos, órganos, protoplastos, etc. Manteniendo los explantes por más de un día en un medio artificial.

Los principales tipos de cultivos de tejidos son:

- Cultivo de células individuales o agregados celulares.
- Cultivo de tejidos, callo, explantes, punta de brotes.
- Cultivos de órganos.
- Cultivos de embriones.
- Cultivos de polen y anteras.

A. Cultivo de brote apical

La utilización de brotes apicales como explantes para el cultivo *in vitro*, reducen considerablemente el grado de contaminación; existe el inconveniente con la oxidación durante la fase de iniciación. Para contrarrestar dicho efecto se han investigado varias concentraciones de antioxidantes como la Polivinilpirrolidona (PVP), combinaciones de ácido cítrico-ácido ascórbico y carbón activo, para determinar la eficiencia en reducir los tejidos oxidados por la producción de fenoles y de esta forma incrementar la eficiencia en la regeneración de plántulas completas (14).

B. Cultivo de Células

Barba y Nickel (1969), (6), demostraron que la producción de plantas de caña de azúcar procedentes de cultivo de tejidos es posible. Se puede decir que las técnicas abarcan la formación de callo y la posterior diferenciación de tejidos.

Según Artschwager, (1925), citado por Pérez Ponce, (31), para el cultivo de la caña de azúcar se emplea cualquier parte de la planta: el meristema subapical, desde el primero hasta el octavo internudo, las hojas jóvenes aún enrolladas, la inflorescencia antes de emerger, los meristemas apicales del tallo y de la raíz, y el parénquima medular. La inflorescencia sin emerger es la mejor, por su alta capacidad de regeneración, la cual no es recomendada en mejoramiento por su baja variabilidad.

Es recomendable las hojas jóvenes tomadas de tallos jóvenes que tengan un rápido y vigoroso crecimiento, Los meristemas subapicales no son recomendables por que se contaminan y por que sufren fenolización. Explantes de la hoja -1 extraídos asépticamente son los más adecuados para un rápido crecimiento de los callos (31).

Alexander en 1973, citado por Méndez Salas, (19), señaló que existían diferencias en la capacidad regenerativa de los callos, mismas que atribuyó a variaciones, en el número cromosómico de las células de la caña de azúcar.

Medio de cultivo: Según Pérez Ponce, (31), la formación de callos en la caña de azúcar es relativamente fácil. Se han empleado los siguientes medios de cultivo con buenos resultados: Heinz y Mee (1969), Murashige y Skoog (1962), White (1963), Heinz et al. (1977) y Liu (1983).

Para la formación del callo, el 2,4-diclorofenoxiacético es la única auxina que debe de manejarse, según la variedad, y la dosis administrada oscila entre 2 y 5 mg/litro (31).

A. Inducción de enraizamiento

Para el enraizamiento de las plántulas se han propuesto diversos métodos para su mejoramiento como: los tratamientos con bajas temperaturas, la poda de las hojas, el burbujeo constante en los medios líquidos. El método más eficiente y práctico, el uso de medios de cultivo capaces de asegurar el enraizamiento.

En los medios de cultivo un alto contenido de sacarosa provoca un bajo porcentaje de supervivencia *in vitro*, causado probablemente del elevado valor osmótico de estos medios. Para la inducción del enraizamiento *in vitro* en plantas de 3 a 5 cm de altura se recomienda siempre contenidos de sacarosa de 4% a 5% (p/v). Cuando no se agrega agua de coco, se obtiene un mejor desarrollo radicular y mayor longitud de las raíces de las plántulas, Maretzaki y Hisaki (1980) proponen un medio que contenga de 7% a 9% de sacarosa y la mitad de la concentración de las sales de MS.

La inducción del enraizamiento de las plantas es más difícil a causa de las concentraciones de citocinina (en especial, de 6-bencilaminopurina) en medios de cultivo que provocan el ahijamiento (31).

3.2 Marco Referencial

3.2.1 Ubicación del área en estudio

El estudio se realizó en la estación experimental de CENGICAÑA, ubicada en la finca Camantulul, Santa Lucia Cotzumalguapa, específicamente en el área de Biotecnología Vegetal. Se encuentra a una distancia de 92.5 km de la ciudad de Guatemala por medio de la carretera CA-1 y a 34 km del departamento de Escuintla. Se localiza en el centro de la zona cañera de Guatemala;

las coordenadas $14^{\circ}19'30''$ latitud norte y longitud $91^{\circ}03' 03''$ Oeste, a una altura sobre el nivel del mar de 280 metros (IGM 1985) (8).

En ese laboratorio de área de Biotecnología Vegetal, se realiza generalmente la micropropagación de caña de azúcar a través del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, el mismo tiene las condiciones y requerimientos adecuados para la realización de investigaciones relacionadas con el cultivo *in vitro*.

La zona cañera que comprende a la finca Camantulul y al área de estudio se encuentra ubicada en tres estratos o zonas altitudinales según la figura 3.

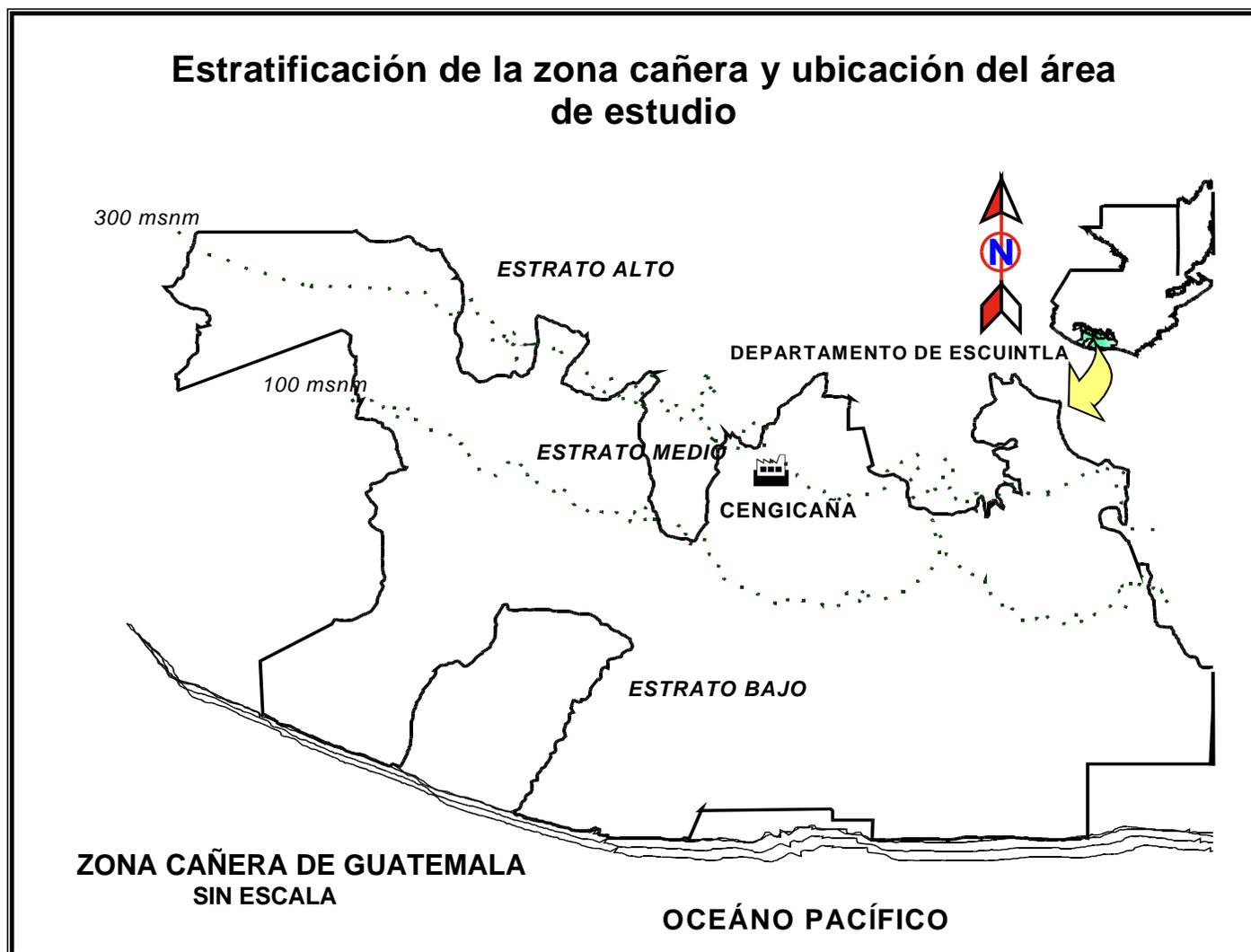


Figura 3. Estratificación de la zona cañera y localización del área de estudio.

3.2.2 Características generales de las variedades de caña de azúcar utilizadas para el ensayo

3.2.2.1 Variedad CP 722086

La variedad Canal Point. 722086 tiene tallos de color amarillo verdoso, posee vigor y es de buen cierre de calle. Su crecimiento es erecto y no posee afate. Es suave para el corte y además desbajera bien. Tiene muy buen retoño, es resistente al carbón y tolerante al mosaico. En lo que respecta a su madurez es altamente floreadora (más del 90%) lo que implica que es una variedad temprana.

Posee nudo obconoidal, anillo de crecimiento prominente y yemas de forma redonda con poro germinativo central (forma de globo). La lígula al nivel del último cuello es de forma creciente con centro ancho. Esta variedad se reconoce a cierta distancia durante la etapa de su crecimiento por un color verde claro rojizo presente sobre la vaina de las hojas.

En el ámbito comercial ha destacado por sus altos tonelajes en el campo y elevada producción de azúcar en fábrica. En la zafra 91-92 presentó un rendimiento de 166.39 toneladas de caña/ha y de 207 lbs/azúcar/ton/caña para producir la cantidad de 1.443 ton.azúcar/ha/mes. (CENGICAÑA).

3.2.2.2 Variedad SP 792233

La SP 792233 es una variedad de alta capacidad de macollamiento y posee follaje abundante de un color verde oscuro cuyas láminas son decumbentes que permiten cierre de calles. El hábito de crecimiento de la variedad es ligeramente inclinada y no presenta ningún tipo de deshoje natural. La floración es considerada escasa y se tiene que sembrar antes del mes de marzo, después de esta fecha aún en la zona alta de la zona cañera de Guatemala (>300 msnm) la variedad no florece.

El entrenudo es curvado ligeramente en zig-zag con abundante cera en la banda cerosa y a lo largo del entrenudo. El nudo tiene forma ligeramente de un cono y el anillo de crecimiento semiancho presenta protuberancia intermedia. El nudo en el lado de la yema mide 12 mm y en el

lado opuesto de la yema 10 mm. La yema de protuberancia respecto al anillo de crecimiento y la cicatriz foliar es una característica de esta variedad. La vaina es verde claro con escasa serosidad y afate y se adhiere parcialmente al tallo.

La aurícula es de dos tipos en la misma lámina foliar, una calcariforme y la transicional ascendente con presencia de vellos en el margen. La forma de la lígula es deltoide con rombo (25, 27).

3.2.2.3 Variedad PR 872080

Esta variedad a la edad de 9 meses se distingue por su follaje abundante cuyas hojas superiores se muestran en forma de espada, un grupo intermedio es decumbente y las hojas bajas caídas. La floración es nula, los tallos crecen erectos y muestran un regular deshoje natural. La forma del entrenudo es cilíndrico ligeramente en zig-zag con abundante cera en la banda cerosa y a lo largo del entrenudo. El canal de la yema es casi superficial que abarca 1/4 del mismo.

El nudo tiene forma de un cilindro y el anillo de crecimiento semiancho presenta protuberancia lisa al tacto. El nudo en el lado de la yema mide 10 mm y en el lado opuesto 6 mm. La yema ligeramente prominente es ovalada con punta corta, en cuya base se localiza adherida a la cicatriz foliar y ligeramente sobrepasa el anillo de crecimiento.

La vaina de la variedad PR 872080, es verde claro con poca cera sin presencia de afate. En la lámina foliar de las aurículas es lanceolada larga y la otra transicional ascendente, ambas se localizan siempre sobre el mismo lado. El último cuello visible es verde claro cuya superficie es lisa y velluda en el borde, la lígula de su patrón es creciente lineal (25, 27).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

4.1.1 Establecer un método para la obtención de brotes de caña de azúcar *in vitro* de las variedades CP 722086, SP 792233 y PR 872080.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Establecer la respuesta de la de 6-Bencilaminopurina en el nivel más adecuado que induzca la mayor proliferación de brotes en la fase de multiplicación, para cada una de las variedades.

4.2.2 Determinar el nivel de 6-Bencilaminopurina, que provoque la inducción de la mayor longitud de brotes en la variedad CP 722086, SP 792233 y PR 872080.

4.2.3 Determinar el nivel de 6-Bencilaminopurina, que estimule a la mayor diferenciación de hojas por brote para cada una de las variedades.

5. HIPÓTESIS

- 5.1 Existe por lo menos un nivel de 6-Bencilaminopurina que induzca a la mayor proliferación de brotes, para cada una de las variedades en la fase de multiplicación.
- 5.2 Al menos un nivel de 6-Bencilaminopurina induce a la mayor longitud de brotes, para cada una de las variedades de caña de azúcar.
- 5.3 Existe por lo menos un nivel de 6-Bencilaminopurina que induzca mayor diferenciación de hojas por brote para cada variedad.

6. METODOLOGÍA

6.1 Localización del experimento

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Centro de Experimentación de Camantulul, CENGICAÑA. El laboratorio esta implementado con instalaciones, equipo y condiciones ambientales adecuadas que llevaron a cabo las diferentes actividades en que consistió el trabajo de la micropropagación de las variedades de caña de azúcar.

6.2 Material vegetal, equipo, cristalería, reactivos, insumos y medio de cultivo usados para la realización del estudio

6.2.1 *Material vegetal experimental*

El material vegetal a evaluar en la investigación consistió en las variedades de caña de azúcar: CP 722086, SP 792233 y PR 872080, las cuales se localizaron y colectaron en los campos de cultivos y germoplasma del centro de experimentación de CENGICAÑA. El equipo y cristalería usado consistió de lo disponible dentro del laboratorio de biotecnología vegetal (Apéndice 20 A). Para los reactivos e insumos se uso lo descrito por Murashige y Skoog y los estudios previos realizados por Cruz, (12) (Apéndice 21 A).

6.2.2 *Preparación de medios de cultivo*

6.2.2.1 *Medio de cultivo*

Prácticamente en las dos etapas de la propagación *in vitro* (iniciación y multiplicación) de la caña de azúcar, se utilizó el medio nutritivo basal descrito por Murashige y Skoog denominado comúnmente MS (1962), el cual ha sido modificado para el cultivo de la caña de azúcar tal como se describe en el cuadro 2, variando únicamente las concentraciones de reguladores de crecimiento y antioxidantes. Dicho medio es considerado apropiado para el cultivo de la caña, y además de ser utilizado para una diversidad de cultivos, el cual es el más completo nutricionalmente (1, 6, 19, 21).

6.2.2.2 *Elaboración de soluciones concentradas*

Para la elaboración de las soluciones concentradas los componentes del medio de cultivo MS, se agruparon de la siguiente forma: Macroelementos, microelementos, quelatos de hierro, vitaminas y reguladores del crecimiento. Se utilizó agua destilada-esterilizada, los recipientes de vidrio color ambar fueron esterilizados a calor seco los cuales se emplearon para guardar dichas soluciones. La finalidad de agrupar los ingredientes en forma de soluciones concentradas es que permite reducir pasos en la preparación del medio de cultivo y evitar precipitación de algunos reactivos. Los volúmenes a preparar dependieron de las concentraciones de las soluciones las cuales fueron a 10X, 100X, 1000X y 5000X.

Cuadro 1. Agrupación de componentes, cantidades y volúmenes para la preparación de soluciones concentradas.

# Sol.	COMPONENTES/REACTIVOS	CANTIDAD DE REACTIVO A AGREGAR PARA EL VOLUMEN DESEADO		
		500 ml	200 ml	100 ml
1	Macronutrientes 10 X			
	NH ₄ NO ₃	8.25 grs.		
	KNO ₃	9.5 grs.		
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.85 grs.		
	KH ₂ PO ₄	0.85 grs.		
2	Micronutriente "A" 1000 X			
	H ₃ BO ₃			0.62 grs
	MnSO ₄ · 4H ₂ O			2.23 grs
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O			0.86 grs.
	Na ₂ Mo ₄ · 2H ₂ O			0.025 grs.
3	Micronutriente "B" 5000 X			
	CuSO ₄ · 5H ₂ O			0.0125 grs.
	CoCl ₂ · 6H ₂ O			0.0125 grs.
4	KI 1000 X			0.083 grs.
5	Ca Cl₂ · 2H₂O 10 X	2.2 grs.		
6	Solución de Hierro 100 X			
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O		0.746 grs.	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O		0.556 grs	
7	Myo-inositol 100 X			1.00 grs
8	Vitaminas 1000 X			
	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS. · H ₂ O			0.01 grs
9	Reguladores del crecimiento			
9.1	C ₁₀ H ₉ NO ₂ 250 ppm			0.0253 grs.
9.2	C ₁₂ H ₁₁ N ₅ 250 ppm			0.0253 grs.
9.3	C ₁₀ H ₉ N ₅ O 250 ppm			0.0253 grs.

Para la preparación de cada una de las soluciones concentradas del MS y reguladores del crecimiento, se procedió de la siguiente manera (cuadro 1): se realizó con la mayor asepsia posible, a los recipientes de solución (beaker) se les agregó agua destilada-esterilizada a un tercio de su capacidad, para luego agregar los diferentes componentes previamente pesados los cuales se mantuvieron en constante agitación.

Para el caso de la solución de hierro (solución 6), fue necesario calentar (40°C) cada reactivo por separado en un beaker de 250 ml de capacidad con 50 ml de agua destilada-esterilizada, para luego realizar la mezcla y aforar a 200 ml. La mayoría de los componentes de los medios básicos son solubles en agua, los reguladores del crecimiento se diluyen en pequeños volúmenes de bases como NaOH, KOH, ácidos como el HCl y alcohol etílico. Cada solución se almacenó en recipientes identificados en la refrigeradora a una temperatura de 2-5°C (1, 20, 31).

6.2.2.3 *Elaboración de los medios de cultivo*

A. *Medios de cultivo para el establecimiento de explantes de tres variedades de caña*

Se tomó como base la preparación de un litro de medio, para lo cual se procedió de la siguiente manera: en un beaker con capacidad de un litro, con un volumen de 500 ml de agua destilada se mezclaron las soluciones concentradas del MS con sus respectivos componentes de reactivos y reguladores del crecimiento, en el orden que se indica en el cuadro 2, utilizando también una fuente de carbohidratos como la sucrosa a concentración de 3% y antioxidantes para luego aforar con agua destilada hasta completar un litro.

Para la homogenización de los agregados fue necesario el uso de una barra magnética y una estufa-agitador. Se ajustó el pH a 5.7-5.8 con NaOH y HCl al 1.0 y 0.1N, luego se agregó agar como gelificante a 0.8%, seguidamente se disolvió dentro del medio para lo cual fue necesario el uso de un microondas.

El medio de cultivo se distribuyó en tubos de ensayo de 150X25 mm, con 15 ml del mismo. Se utilizó medios líquidos y sólidos, para el caso del primero fue necesario el uso de puentes de papel filtro que sirvió de soporte al explante (15). Para la esterilización, ésta consistió en el uso de autoclave durante 20 minutos, a una presión de 1.05 kg/cm² y a una temperatura de 121 °C.

Cuadro 2. Volumen de soluciones concentradas para la preparación de un litro de medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), para el establecimiento de los explantes *in vitro*.

ETAPA MICROPROPAGACIÓN	# Sol.	COMPONENTES	[]	Para un litro de medio de cultivo (ml)
Iniciación o establecimiento	1	Macronutrientes	10 X	100
	2	Micronutriente "A"	1000 X	1
	3	Micronutriente "B"	5000 X	200*
	4	KI	1000 X	1
	5	Ca Cl ₂ · 2H ₂ O	10 X	100
	6	Hierro	100 X	10
	7	Myo-inositol	100 X	10
	8	Tiamina (0.1mg/l)	1000 X	1
	9	AIA (0.5 mg/l)	250 ppm	2
	10	AG3 (0.5 mg/l)	250 ppm	2
	11	BAP(tratamientos)**	250 ppm	2.4
	12	Cinetina (0.5 mg/l)	250 ppm	2
	14	Ácido cítrico	150 ppm	0.15 grs
	13	Sucrosa	3 %	30 grs
	15	PH	5.7-5.8	
Multiplicación o evaluación de tratamientos de BAP	16	AIA (0.01 mg/l)	250 ppm	40*
	17	BAP (tratamientos)	250 ppm	**
	18	Cinetina (0.1 mg/l)	250 ppm	400*
	19	Ácido cítrico	150 mg/l	0.15 grs

* Volumen agregado en microlitos. 1ul = 0.001 ml.

** Diferentes Niveles de BAP.

B. Medios de cultivo para la etapa de multiplicación o evaluación de tratamientos de BAP

Los medios de cultivo empleados para esta etapa, las sales de MS no variaron en lo absoluto al igual que la sucrosa y el pH, la única variante fue la disminución de la auxina (AIA) y la cinetina, el uso del GA₃ no fue necesario (cuadro 2), la aplicación de ácido cítrico como antioxidante fue imprescindible, seguidamente se aplicó los niveles de BAP para su evaluación (Cuadro 3). El medio de cultivo fue líquido, el cual se depositó en recipientes de vidrio de 200 ml de capacidad, aproximadamente 25 ml de medio.

Cuadro 3. Reguladores del crecimiento y niveles de BAP aplicados al medio de cultivo en las tres variedades de caña de azúcar.

MEDIO BASAL	REGULADORES DEL CRECIMIENTO			CONCENTRACIONES (mg/l)
	AIA (mg/l)	CINETINA (mg/l)	BAP (mg/l)	
MS	0.01	0.10	0.00	0.01/0.10/0.00
			0.15	0.01/0.10/0.15
			0.30	0.01/0.10/0.30
			0.45	0.01/0.10/0.45
			0.60	0.01/0.10/0.60
			0.75	0.01/0.10/0.75

MS = Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (21).

6.3 Fase experimental

Con fines de un manejo adecuado de la investigación y debido al grado de dificultad que presentó la micropropagación de la caña de azúcar, el estudio se desarrolló en dos fases las cuales fueron: La fase de iniciación o el establecimiento de los explantes, básicamente consistió en adaptar los materiales vegetales de las tres variedades al cultivo *in vitro*, en la fase de multiplicación se utilizaron los explantes provenientes de la anterior fase, previo a una selección de los brotes, para luego evaluar los niveles de 6-bencilaminopurina.

6.3.1 FASE I

En esta fase se realizó una serie de pruebas preliminares, con la finalidad de prevenir la oxidación, la contaminación por microorganismos y sobrevivencia de los explantes: una de ellas consistió en evaluar antibióticos y antioxidantes previo al establecimiento de los explantes al cultivo de tejidos, utilizándose la metodología descrita por Cruz (12), para lo cual se utilizó la combinación de ácido cítrico (0.4%) y ácido ascórbico (0.2%) como antioxidantes y Sulfato de estreptomycin y oxitetraciclina (Agrimycin WP 16.5%) a 0.15%, methyl-1-(butylcarbamoil)-2-benzimidazolecarbamoilato (Benomyl WP 50%) a 0.1% y cloranfenicol sulfato a 500 ppm como antibióticos (0.4/0.2/0.15/0.1/500).

Para el control del oscurecimiento oxidativo en explantes de las tres variedades de caña de azúcar se evaluó el efecto de antioxidantes, según estudios realizados por Cruz (12), utilizándose el ácido cítrico en el medio de cultivo a 150 mg/l previo a la evaluación realizada con l-cisteína (10

mg/l) y polivinylpirrolidona (P.V.P.) (0.05%). La finalidad de esta fase, fue la de propagar el suficiente material vegetal para su utilización en la fase II.

Se sembraron ápices meristemáticos de las variedades CP 722086, SP 792233 y PR 872080. Se utilizó el medio descrito en el cuadro 2, para el establecimiento de los explantes de las variedades al cultivo *in vitro*.

6.3.1.1 Colecta del material vegetal

El material vegetal se colectó de las plantaciones y del banco de germoplasma de caña de azúcar de las variedades en estudio. Se seleccionaron los materiales que presentaron un buen estado fisiológico libre de enfermedades y de plagas. La parte de la planta empleada consistió del ápice meristemático, para lo cual se cortó de 20-30 cm de la parte apical de la planta, utilizándose una navaja previamente desinfectada en una solución de methyl-1-(butylcarbamoil)-2-benzimidazolecarbamato Benomyl WP 50% (0.1%), los trozos de material vegetal se sumergieron en una solución de fungicidas-bactericidas, que luego se trasladaron al área de laboratorio, pero antes del ingreso al mismo se eliminó la mayor parte de la envoltura vegetal que se encontraba sucia y con algún daño superficial (1, 11, 12).

6.3.1.2 Desinfestación del material vegetal

Dentro del laboratorio se procedió a eliminar hojas superficiales y se dejó cogollos o punteros de un tamaño de 3-5 cms, los cuales se colocaron en una solución de fungicida-bactericida (benomyl WP 50% + agrimycin WP 16.5%) y antioxidantes para disminuir la contaminación y prevenir tempranamente el ennegrecimiento de los explantes, los cuales se incubaron por 24 horas a una temperatura de 5 °C (12).

Luego el material se introdujo a una solución de alcohol etílico al 70% durante 2 minutos. Los cogollos se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos, a esta solución se le agregó 2 gotas de Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (tween 20) y luego se agitó con una pinza esterilizada para uniformizar el proceso de desinfestación, este reactivo actúa como surfactante para que el proceso sea más eficiente (1, 20).

Se realizaron 3 lavados al material vegetal con agua destilada-estéril, utilizándose

recipientes esterilizados para tal actividad dentro de la cámara de flujo laminar. Luego el material vegetal se introdujo en una solución de ácido cítrico a 100 ppm, esterilizado.

6.3.1.3 *Disección y extracción del explante*

Utilizando cajas de petri esterilizadas, pinzas y bisturíes y con 3-5 ml de ácido cítrico a 150 ppm, se procedió a la disección del explante para lo cual se eliminó las envolturas más profundas que recubre y protegen al ápice meristemático, luego se procedió a la extracción del explante (ápice meristemático) con dos primordios foliares, el cual consistió de un tamaño de 3-5 mm.

6.3.1.4 *Siembra*

Para la fase I, los explantes se sembraron en medio MS sólido, la colocación de los mismos fue de forma invertida, es decir con la parte de crecimiento (ápice) sumergida en el medio de cultivo. Se utilizaron tubos de ensayo de 150X25 mm, con 15 ml de medio. El tamaño del explante fue de 3-5 mm, con dos primordios foliares (31). Luego se transfirieron los cultivos al cuarto de incubación, se colocaron a 26 ± 2 °C y en total oscuridad por un período de 8 días.

En el transcurso de 1 a 1½ semanas los explantes se transfirieron a medios líquidos utilizando puentes de papel filtro como soporte para el explante, con los mismos componentes que el medio sólido, incubándose bajo las mismas condiciones, pero con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, utilizando luz de gas neón controlada de aproximadamente 1000 lux y agitación constante (12, 31).

En un lapso de tiempo los explantes produjeron brotes para lo cual fue necesario la transferencia y división de macollas a nuevos medios. Se procedió a multiplicar los explantes de las variedades de caña SP 792233, PR 872080 y CP 722086, con la finalidad de obtener un brote de un tamaño de 3 cm de longitud y un grosor de 2-3 mm, para lo cual se requirió 800 a 900 cultivos y de 150 a 180 días.

6.3.2 FASE II

En dicha fase se evaluó el efecto de los niveles de BAP, el tipo de explante proveniente de la fase I, fue seleccionado e inoculado en los diferentes niveles del regulador de crecimiento, con

la finalidad de encontrar la respuesta de acuerdo a las variables en estudio, dicha fase consistió de un brote como explante y 30 días en incubación.

6.3.2.1 Siembra

Para la inoculación de los explantes en esta fase, se utilizó el medio descrito en la Cuadro 2 con sus respectivos niveles de BAP, más la aplicación de ácido naftalenacético a 0.01 mg/l como auxina y una citocinina (cinetina a 0.1 mg/l), a la vez se utilizó el antioxidante ácido cítrico a razón de 150 ppm en cada uno de ellos (12).

Los cultivos fueron transferidos al cuarto de incubación, el cual con una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y luz de gas neón color blanca controlada de 1000 lux aproximadamente, fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, proporcionó las condiciones adecuados para la evaluación del BAP, durante 180 días y 30 días más que duro esta segunda fase para hacer un total de 210 días que duraron las dos fase de la micropropagación y la investigación respectiva de las variedades de caña de azúcar CP 722086, SP 792233 y PR 872080.

6.4 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, bifactorial 3 x 6, en arreglo combinatorio. Con 5 niveles de BAP más un testigo absoluto, siendo un total de 6 tratamientos y se evaluaron 3 variedades de caña de azúcar, para el caso del número de repeticiones éste fue de 10.

6.5 Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} = Variable de respuesta en la ijk -ésima unidad experimental.
- μ = Efecto de la media general.
- A_i = Efecto del i -ésima variedad.
- B_j = Efecto de la j -ésimo nivel de BAP.
- AB_{ij} = Efecto de la interacción de la i -ésima variedad, j -ésimo nivel de BAP.
- E_{ijk} = Error experimental asociado a la ijk -ésima unidad experimental.

6.6 Descripción de los tratamientos

Los factores a considerar en el estudio fueron las variedades de caña de azúcar: CP 722086, SP 792233 y PR 872080 y el regulador de crecimiento BAP con sus respectivos niveles (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Factores y niveles que se evaluaron en el estudio.

FACTORES		NIVELES					
A	Variedades	A1		A2		A3	
		CP 722086		SP 792233		PR 872080	
B	BAP (mg/l)	B1	B2	B3	B4	B5	B6
		0.00	0.15	0.30	0.45	0.60	0.75

Cuadro 5. Descripción de los tratamientos.

TRATAMIENTOS		
#	Código	Descripción
		Variedad X mg/l BAP
1	A1B1	CP 722086 X 0.00
2	A1B2	CP 722086 X 0.15
3	A1B3	CP 722086 X 0.30
4	A1B4	CP 722086 X 0.45
5	A1B5	CP 722086 X 0.60
6	A1B6	CP 722086 X 0.75
7	A2B1	SP 792233 X 0.00
8	A2B2	SP 792233 X 0.15
9	A2B3	SP 792233 X 0.30
10	A2B4	SP 792233 X 0.45
11	A2B5	SP 792233 X 0.60
12	A2B6	SP 792233 X 0.75
13	A3B1	PR 872080 X 0.00
14	A3B2	PR 872080 X 0.15
15	A3B3	PR 872080 X 0.30
16	A3B4	PR 872080 X 0.45
17	A3B5	PR 872080 X 0.60
18	A3B6	PR 872080 X 0.75

6.7 Unidad experimental

La unidad experimental fue constituida por un recipiente de vidrio resistente al proceso de esterilización con autoclave, con una capacidad de 200 ml y dimensiones de 105 x 50 mm, al cual

se le agregaron 25 ml de medio de cultivo MS líquido y su respectivo nivel de regulador del crecimiento -bencilaminopurina- más 0.01 mg/l de AIA, 0.1 mg/l de Cinetina y 150 ppm de ácido cítrico. El explante consistió de un brote de 3.00 cm de largo proveniente de los cultivos establecidos, multiplicados y seleccionados de la fase I.

El total de unidades experimentales fue de 180 unidades, producto de las 3 variedades (CP 722086, SP 792233 y PR 872080), 5 niveles de BAP, más 1 testigo (0.00 mg/l de BAP) y 10 repeticiones.

6.8 Variables Respuesta

6.8.1 Número de brotes por explante

Para determinar la respuesta de los explantes a los diferentes niveles del regulador del crecimiento BAP, se registró el número de brotes adventicios inducidos por explante, a los 15 y 30 días de realizada la siembra. Para la toma de datos fue necesario extraer la macolla (conjuntos de brotes) de los recipientes de vidrio para cuantificarlos.

6.8.2 Longitud de brotes

Para establecer los cambios en el crecimiento de los brotes se registró la longitud de los mismos, ésta se tomó de la base al ápice de cada brote reportándose en cm. La variable se registró a los 15 y 30 días después de la siembra. Extraída la macolla de los recipientes se procedió a separar cada brote para medir su longitud utilizándose una regla graduada en cm.

6.8.3 Número de hojas por brote

Para determinar la dinámica del crecimiento de los brotes se realizó el conteo del número de hojas de los mismos por separado. Para la toma de datos ésta se realizó a los 15 y 30 días de realizada la siembra.

6.9 Análisis de la información

El experimento se analizó de manera factorial, las tres variedades de caña de azúcar y los niveles de BAP se investigaron de forma simultánea, ambos factores se probaron en todas las combinaciones posibles en un arreglo factorial.

Para una adecuada interpretación de la información al realizar los ANDEVA, se verificó los supuestos de la normalidad de los errores experimentales, la independencia de error y la homogeneidad de varianzas. Para el caso de la normalidad se utilizó la prueba de Shapiro & Wilk (normalidad de residuos), el cual es un método gráfico en donde se ploteó RES*PRES en el programa estadístico SAS (Statistical Análisis System) y para la independencia de error, no se efectuó prueba alguna debido a que la aleatorización al momento de manejar el experimento se realizó de manera correcta.

Se determinó que los datos analizados no cumplieron con algunas de las suposiciones (distribución asimétrica, correlación positiva entre las medias y las varianzas de los tratamientos), por tal razón se procedió a la transformación de los datos originales de las variables como se describe en el cuadro 6. El uso de esta medida correctiva fue para validar el ANDEVA e incrementar la precisión para poder medir las diferencias entre las medias de los tratamientos y de tal manera se generó conclusiones y recomendaciones más reales.

Cuadro 6. Tipo de transformación empleada en las variables de estudio en las tres variedades de caña de azúcar, a los 15 y 30 días después de la siembra.

VARIABLE	TIPO DE TRANSFORMACIÓN EMPLEADA	
	Nombre	Ecuación
Número de brotes	Raíz cuadrada	$Y' = \sqrt{Y+1}$
Longitud de brotes	Logarítmica	$Y' = \text{Log}(Y+1)$
Número de hojas	Raíz cuadrada	$Y' = \sqrt{Y+1}$

A los datos transformados se les realizó el análisis de varianza para cada variable de respuesta, y una prueba de Tukey al 5% de significancia aquí los datos de las medias fueron reconvertidas a la escala original, para determinar el mejor tratamiento. La utilidad de la separación de medias, fue para seleccionar el o los tratamientos que dieron significancia al análisis de varianza en base a la comparación de las medias de los tratamientos. Para dicho ensayo, se necesitaba una severidad alta por tal razón la prueba de Tukey al 5%, detectó diferencias entre medias altas, para declarar diferencias significativas entre los tratamientos.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Esta investigación se realizó en dos fases: la primera consistió en una etapa inicial o el establecimiento de explantes, y la etapa de multiplicación en donde se evaluó el efecto de la 6-bencilaminopurina, en las tres variedades de caña de azúcar siendo estas: CP 722086, PR 872080 y SP 792233.

7.1 FASE I, INICIAL: PRUEBA DE ANTIOXIDANTES

Para el establecimiento de material *in vitro* de caña de azúcar se realizaron ensayos preliminares, se evaluaron antioxidantes como Ácido Cítrico, L-cisteína y Polivinilpirrolidona (P.V.P), a una concentración de 150 mg/l, 10 mg/l y 0.05%. Para determinar el antioxidante adecuado en las variedades de caña de azúcar se requirió de 90 días, e iniciándose a la vez su adaptación *in vitro*; y de 150 a 180 días aproximadamente para obtener el explante adecuado, el cual fue seleccionado con un tamaño de 3 cm de longitud y con una vigorosidad tomando en cuenta al color y grosor de 2-3 mm.

El cultivo de la caña de azúcar, presentó dificultad para su propagación al cultivo de tejidos, debido a la alta oxidación. Villalobos, (44), menciona que el problema de la oxidación fenólica se debe a la alta tasa de respiración del tejido, provocada por la liberación de energía para realizar actividades de la planta mediante la oxidación de algunos compuestos de carbono; lo cual induce en la producción de compuestos fenólicos en la herida del tejido. En el medio (sólido) los exudados producidos, son atrapados acumulándose hasta formar un área negra alrededor del explante. De esta manera se interfiere en la absorción de nutrientes y se inhibe el crecimiento, que por lo tanto la adaptación de los explantes en la etapa de iniciación se tornó difícil.

En el establecimiento de la variedades de caña de azúcar se observó un exudado naranja-oscuro a café-oscuro que se difundió en el medio de cultivo que fue perjudicial para el desarrollo de los ápices meristemáticos los cuales se necrosaron y murieron. George, (14), Villalobos, (44), indican que este proceso está influido por enzimas monofenol oxidasa (tirosinasa) y la polifenol oxidasa (catecol oxidasa), convirtiendo los fenoles liberados en la herida a quinonas. Por lo anterior las variedades en estudio: CP 722086, PR 872080 y SP 792233, la fase inicial o establecimiento fue determinante. Pérez Ponce, (31), en el estudio realizado con *Saccharum*

officinarum menciona que dicho cultivo es recalcitrante al establecimiento *in vitro*. Por otra parte CENGICAÑA, menciona específicamente que la CP 722086 y PR 872080 no se han podido propagar, debido a la presencia de oxidación que provoca prematuramente la muerte del explante, dificultando su reproducción clonal a nivel de cultivo de tejidos.

La variedad que presentó mayor oxidación fue SP 792233, la CP 722086 con una oxidación intermedia y la PR 872080 en menor porcentaje, por tal razón el uso de antioxidantes fue de suma importancia, tanto en la fase de iniciación como en la fase de multiplicación, resultando el mejor tratamiento para este caso el ácido cítrico a 150 mg/l para ambas variedades de caña de azúcar. Lo anterior coincide con lo reportado por Cruz, (11), quien indica que el ácido cítrico a una concentración de 150 ppm redujo considerablemente el efecto de la oxidación en las variedades PR 872080, CP 722086 y SP 792233 siendo ésta última la de mayor oxidación al cultivo *in vitro*.

7.2 FASE II, DE MULTIPLICACIÓN: EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE BAP

En esta fase, se utilizó como explante brotes provenientes de la fase inicial, los cuales se seleccionaron de una manera estándar en cuanto a tamaño y vigorosidad para la realización de la evaluación de los tratamientos de 6-bencilaminopurina, esto en base a las variables de estudio en las tres variedades.

Cabe mencionar que para la evaluación de las dosificaciones de BAP, fue necesario incluir en el medio de cultivo (MS) ácido cítrico a una concentración de 150 mg/l, más una auxina (ácido indolacético a 0.01 mg/l), suplementado con cinetina a razón de 0.1 mg/l. Pérez Ponce, (31), mencionan que al suplementar en el medio de cultivo una auxina y cinetina con BAP existe un efecto de sinergismo en la cual la estimulación de la brotación se incrementa; al respecto coinciden Shurkla (36) y Suavaire (38) en donde indican que la combinación de cinetina y BAP son importantes para la multiplicación de brotes y la incorporación de AIA al medio de cultivo produce mayor longitud de los mismos en el cultivo de la caña.

Para la evaluación de los tratamientos y conocer la respuesta de los explantes de las variedades de caña de azúcar, fue necesario la realización de dos etapas: una de ellas a los 15 y a los 30 días después de realizada la siembra.

7.2.1 Evaluación de tratamientos de BAP, a los 15 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

7.2.1.1 Análisis de Número de Brotes a los 15 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

Cómo se indica en el cuadro 7, el análisis de varianza para la variable de respuesta número de brotes, los factores: variedad y BAP es significativo, caso contrario al factor de la interacción variedad x BAP, en la cual no existió significancia debido a que el $Pr > F = 0.3816$ es mayor al 5% de significancia. Además la variable número de brotes presentó un coeficiente de variación de 22.50%, en el cual los datos se establecen en un rango aceptable.

Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable número de brotes, a los 15 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$), CENGICAÑA 2003.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Variedad	2	25.07122952	12.53561476	35.48	0.0001 *
BAP	5	13.81216171	2.76243234	7.82	0.0001 *
Variedad x BAP	10	3.81074386	0.38107439	1.08	0.3816 NS
Error	162	57.23741394	0.35331737		
Total	179	99.93154902			

C.V. = 22.50%

* Diferencia significativa (5%)

NS No significativo (> 5%)

A. Número de Brotes según la variedad, en tres variedades de caña de azúcar

Con la utilización de la prueba de medias Tukey al 5%, se determinó que la variedad de caña de azúcar PR 872080, con una media estadística de 10.04, produjo la mayor cantidad de brotes en los diferentes niveles de BAP evaluados, las variedades CP 722086 y SP 792233 se consideran estadísticamente iguales con 5.83 y 5.49 brotes/explante (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según el factor variedad, para la variable número de brotes.

Variedad	Media número de brotes	Agrupación de Tukey al 5% *
PR 872080	10.04	A
CP 722086	5.83	B
SP 792233	5.49	B

* No existe diferencia significativa en medias con la misma letra.

La variedad con el mayor número de brotes para los diferentes niveles de BAP, después de los 15 días de la siembra fue la PR 872080, por tal razón se considera que la respuesta a la aplicación de BAP al medio de cultivo produce un efecto inductor de brotes considerablemente alto en las condiciones *in vitro*, sin descartar las variedades CP 722086 y SP 792233 en las cuales dicho efecto inductor fue igual estadísticamente, pero menor en relación a la primera variedad. La característica de la CP 722086, se evidencia en la baja proliferación y recalcitrante al cultivo *in vitro* por efectos de la alta producción de compuestos fenólicos en la etapa de multiplicación. La SP 792233 produjo un tamaño de brote sumamente pequeño por lo que poco se diferenciaron, dificultando hasta cierto punto su cuantificación (Figura 4).

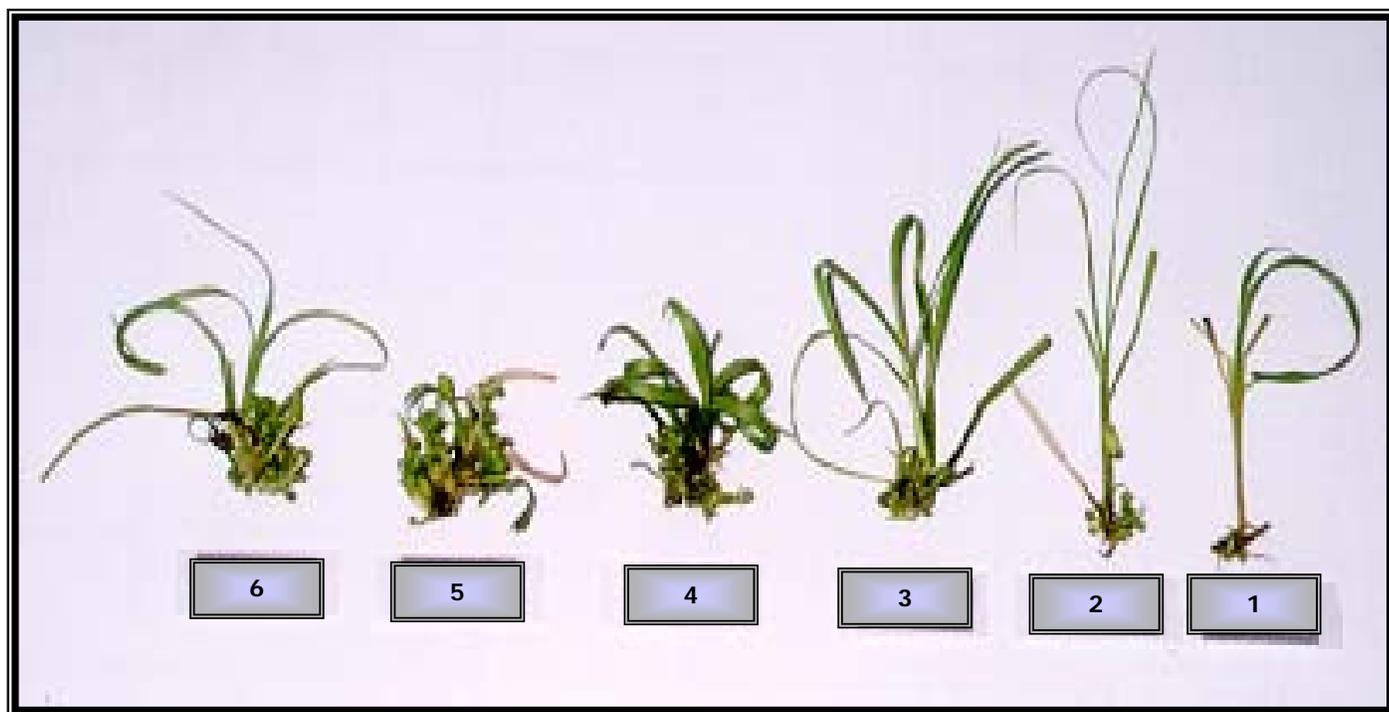


Figura 4. Efecto de los tratamientos de BAP en el número de brotes, en la variedad SP 792233 y característica de tamaño de sus brotes, a los 15 días después de la siembra. CENGICAÑA, 2003. (1 = 0.00, 2 = 0.15, 3 = 0.30, 4 = 0.45, 5 = 0.60 y 6 = 0.75 mg/l de BAP)

B. Número de Brotes según el nivel de BAP, en tres variedades de caña de azúcar

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% (Cuadro 9), para el factor nivel de BAP, el nivel con 0.75 mg/l, presentó el mayor número de brotes. Estadísticamente los niveles 0.45, 0.30, 0.60 y 0.15 mg/l de BAP produjeron similar cantidad de brotes en las variedades de caña de azúcar en estudio.

Cuadro 9. Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según el factor nivel de BAP, para la variable número de brotes.

Nivel de BAP (mg/l)	Media número de brotes	Agrupación de Tukey al 5%		
0.75	8.95	A		
0.45	8.19	A	B	
0.30	7.26	A	B	
0.60	7.22	A	B	
0.15	6.15		B	C
0.00	4.55			C

* No existe diferencia significativa en medias con la misma letra.

Por otra parte el nivel que presentó la menor media en la brotación fue el tratamiento 0.00 mg/l siendo el testigo, sin aplicación de BAP al medio de cultivo, por tal razón no se observó estimulación a la inducción de brotes en los explantes para el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar, como lo demuestra la media de 4.55 brotes.

7.2.1.2 Variable longitud de brotes a los 15 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

El análisis de varianza para la variable de respuesta longitud de brotes (Cuadro 10), mostró diferencia significativa para los factores: variedad, BAP y la interacción variedad x BAP. El coeficiente de variación fue el 10.05%, el cual indica que el manejo del experimento para esta variable fue adecuado.

Cuadro 10. Análisis de varianza para la variable longitud de brotes, a los 15 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \text{Log}(Y+1)$ }, CENGICAÑA 2003.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Variedad	2	1.42631030	0.71315515	44.69	0.0001 *
BAP	5	0.51112000	0.10222400	6.41	0.0001 *
Variedad x BAP	10	0.47953240	0.04795324	3.01	0.0017 *
Error	162	2.58489329	0.01595613		
Total	179	5.00185599			

C.V. = 10.05%

* Diferencia significativa (5%)

A. Variable longitud de brotes según la interacción variedad x BAP, a los 15 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

La prueba de Tukey correspondiente a la interacción variedad x BAP (Cuadro 11) muestra que los tratamientos PR 872080x0.00 mg/l, SP 792233x0.00 mg/l, PR 872080x0.45 mg/l y PR 872080x0.60 mg/l, produjeron la mayor longitud de brotes de las variedades de caña de azúcar. Los tratamientos PR 872080x0.15 mg/l, PR 872080x0.30 mg/l, PR 872080x0.75 mg/l, CP 722086x0.00 mg/l, SP 792233x0.15 mg/l, CP 722086x0.30 mg/l, SP 792233x0.75 mg/l, CP 722086x0.15 mg/l, CP 722086x0.45 mg/l, CP 722086x0.60 mg/l, SP 792233x0.60 mg/l, SP 792233x0.30 mg/l y CP 722086x0.75 mg/l, produjeron similar longitud de brotes; el tratamiento SP 792233x0.45 mg/l fue el que presentó la menor media 1.20 cms, y por lo consiguiente la menor longitud de brotes de todo el estudio.

En la variedad PR 872080 y SP 792233, sin la aplicación de BAP (0.00 mg/l) que corresponde al testigo se produjo la mayor longitud de brotes, al igual que los niveles 0.45 y 0.60 mg/l de BAP para el caso de la variedad PR 872080.

Cuadro 11. Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP para la variable longitud de brotes.

Tratamiento		Media longitud de brotes (cm)	Agrupación de Tukey al 5%				
Variedad	mg/l BAP						
PR 872080	0.00	2.62	A				
SP 792233	0.00	2.58	A				
PR 872080	0.45	2.58	A				
PR 872080	0.60	2.57	A				
PR 872080	0.15	2.31	A B				
PR 872080	0.30	2.25	A B C				
PR 872080	0.75	2.20	A B C				
CP 722086	0.00	1.91	A B C D				
SP 792233	0.15	1.86	A B C D				
CP 722086	0.30	1.78	A B C D E				
SP 792233	0.75	1.50	B C D E				
CP 722086	0.15	1.47	C D E				
CP 722086	0.45	1.45	C D E				
CP 722086	0.60	1.40	D E				
SP 792233	0.60	1.40	D E				
SP 792233	0.30	1.35	D E				
CP 722086	0.75	1.34	D E				
SP 792233	0.45	1.20	E				

* No existe diferencia significativa en medias con la misma letra.

- a. Descripción de la variedad según la interacción variedad x BAP para la variable longitud de brotes, a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar**
- i. Variedad PR 872080, según la interacción variedad x BAP a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar**

Según el análisis estadístico de la prueba de medias de el cuadro 11, se observa para el caso de esta variedad en el nivel 0.00 mg/l (testigo) sin la aplicación de BAP y los niveles 0.45 y 0.60 mg/l de BAP produjeron igual longitud de brotes, por tal razón al aplicar o no el regulador de crecimiento al medio de cultivo, estadísticamente se tiene el mismo efecto en dicha variable.

En relación a los tratamientos evaluados 0.15, 0.30 y 0.75 mg/l de BAP, estadísticamente son considerados intermedios para el caso de la longitud de los brotes. Con la aplicación del regulador BAP y al elevar los niveles existe una disminución en la longitud de brotes, como se evidencia en los niveles anteriormente descritos. Por tal razón, la longitud es afectada

negativamente por las citocininas, por que al existir mayor formación de brotes la longitud es menor, como se evidencia en el nivel con 0.75 mg/l de BAP.

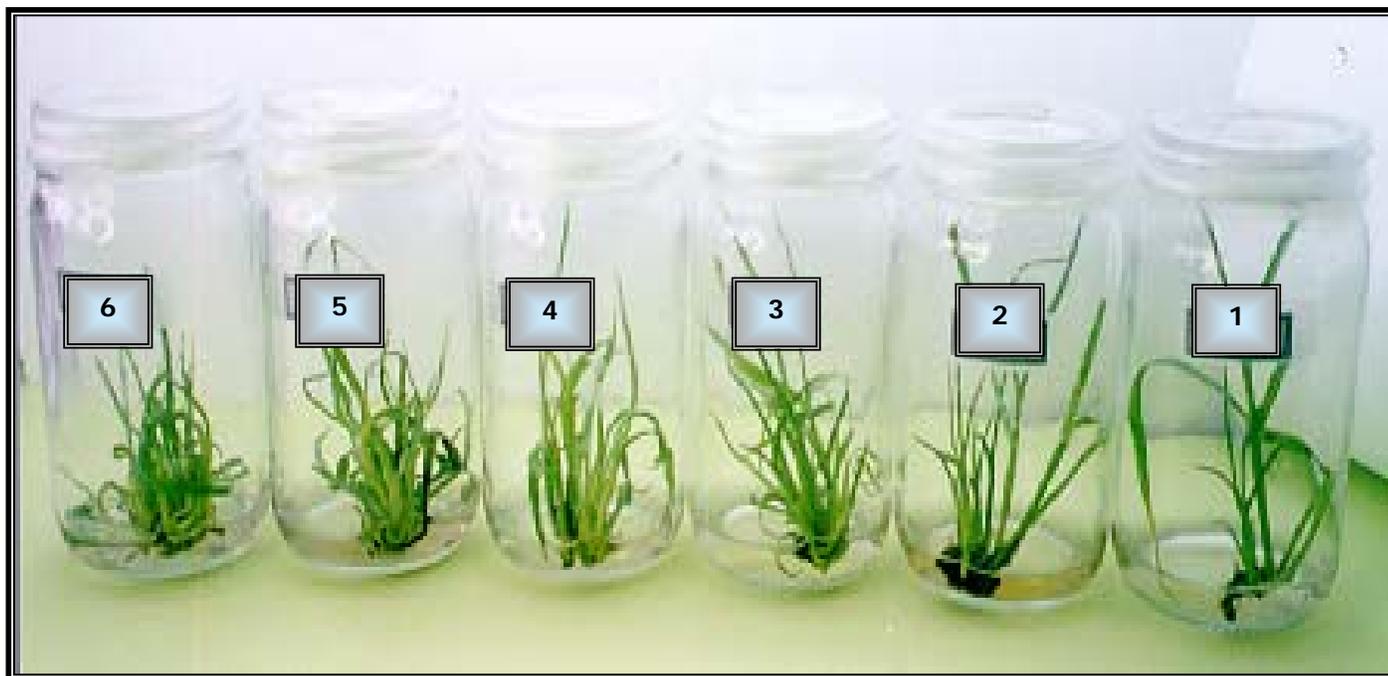


Figura 5. Efecto de los tratamientos de BAP en la longitud de los brotes, en la variedad PR 872080, a los 15 días después de la siembra. CENGICAÑA, 2003. (1 = 0.00, 2 = 0.15, 3 = 0.30, 4 = 0.45, 5 = 0.60 y 6 = 0.75 mg/l de BAP)

ii. Variedad SP 792233, según la interacción variedad x BAP a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar

En el cuadro 11, se observa tres diferentes agrupaciones, para el caso de la SP 792233, en donde el tratamiento con 0.00 mg/l de BAP, produjo una mayor longitud de brotes para dicha variedad, éste sin la aplicación de BAP al medio de cultivo (testigo), y con media de 2.58 cm/brote. Para el caso de los tratamientos con los niveles 0.15, 0.75, 0.60 y 0.30 mg/l de BAP, estadísticamente son considerados iguales para la longitud de los brotes evaluados, según se indica en las medias 1.86, 1.50, 1.40 y 1.35 cm/brote.

Se considera al tratamiento con un nivel de 0.45 mg/l de BAP, el cual se determinó como el de menor respuesta a esta variable, y en base a su media de 1.20, siendo la más baja en el experimento.

iii. Variedad CP 722086, según la interacción variedad x BAP a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar

De acuerdo a la prueba de Tukey, la interacción variedad x BAP, aplicada a los datos obtenidos (Cuadro 11) de la variedad de caña de azúcar CP 722086, la longitud de brotes disminuyó en relación al aplicar o no aplicar el regulador de crecimiento BAP al medio de cultivo, lo cual estadísticamente lo indican los tratamientos con los niveles 0.00, 0.30, 0.15, 0.45, 0.60 y 0.75 mg/l de BAP. Con estos datos y según la prueba de medias son considerados estadísticamente intermedios para la variable longitud de brotes, a los 15 días después de la siembra del presente experimento. Pero, al analizar detenidamente el comportamiento de los tratamientos, observamos que, con niveles del regulador del crecimiento BAP altos, influyó en el poco crecimiento en longitud de los brotes.

Podemos observar que el nivel 0.00 mg/l de BAP, con una media estadística de 1.91 la longitud de brotes fue mayor, esto comparado con el nivel con una dosis de 0.75 mg/l de BAP en el cual se evidencia la disminución de dicha variable.

La bencilaminopurina induce a la proliferación de brotes en una diversidad de cultivos, en particular la caña de azúcar, por lo que su efecto fue evidente en la disminución de la longitud de brotes en la variedad CP 722086, observándose en los niveles 0.15, 0.30, 0.45, 0.6 y 0.75 mg/l de BAP del presente estudio. George, (14), indica que las citocininas reducen la dominancia apical en brotes de las plantas, fortaleciendo el crecimiento de los brotes laterales, menciona a la vez que cuando el porcentaje de citocinina es alto, existe la proliferación de brotes pequeños y disminuye considerablemente la elongación.

7.2.1.3 Variable número de hojas, a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar

Según el análisis de varianza (Cuadro 12), existieron diferencias estadísticas significativas entre los factores variedad y BAP, al igual que la interacción variedad x BAP. La variable número de hojas presentó un coeficiente de variación de 4.10%, a los 15 días después de la siembra, estadísticamente se presentó homogeneidad en los datos para dicha variable.

Podemos observar que para las tres variedades de caña de azúcar: PR 872080, CP 722086 y SP 792233 el número de hojas fue constante en un rango de 4.07 a 5.02 hojas por brote.

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable número de hojas, a los 15 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$)}, CENGICAÑA 2003.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Variedad	2	0.19157760	0.09578880	12.44	0.0001 *
BAP	5	0.14174900	0.02834980	3.68	0.0035 *
Variedad x BAP	10	0.52918482	0.05291848	6.87	0.0001 *
Error	162	1.24695678	0.00769726		
Total	179	2.10946820			

C.V. = 4.10%

* Diferencia significativa (5%)

A. Variable número de hojas según la interacción variedad x BAP

Por medio de la prueba de Tukey (Cuadro 13), se agrupó a las variedades PR 872080, SP 792233 y CP 722086 en base al número de hojas, éstas a los 15 días después de la siembra, las cuales presentaron diferencia en los niveles del regulador de crecimiento BAP. En el primero, el tratamiento en donde la variedad PR 872080 en el testigo (0.00 mg/l de BAP) produjo 5.02 hojas/brote.

En una segunda agrupación existe la combinación de varios tratamientos de las tres variedades por tal razón fue relevante la discusión de cada una por separado, esto basado en el análisis de la prueba de Tukey, y a la vez como una tercera agrupación produciendo la PR 872080 el menor número de hojas (4.07), en el nivel más alto de BAP con 0.75 mg/l.

a. Descripción de las variedades según la interacción variedad x BAP para la variable número de hojas, a los 15 días después de la siembra

i. Variedad PR 872080, según la interacción variedad x BAP, para la variable número de hojas a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar

Según la prueba de Tukey al 5% (Cuadro 13), ésta variedad en el tratamiento 0.00 mg/l, produjo mayor número de hojas, según indica la media 5.02 hojas/brote, cuyo valor es el más alto

del resto de tratamiento evaluados, por tal razón ese mismo nivel, es considerado hasta cierto punto como el de mayor diferenciación de hojas para esta variable. Caso contrario, se indica con el tratamiento en donde el nivel con 0.75 mg/l de BAP, siendo la concentración más alta indujo menor número de hojas, y a la vez se fundamenta con la media 4.07 hojas/brote. Por tal razón al existir mayor concentración BAP en el medio de cultivo, la diferenciación de hojas se reduce y por lo tanto la cantidad de las mismas.

Cuadro 13. Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP para la variable número de hojas.

Tratamiento		Media número de hojas	Agrupación de Tukey al 5%				
Variedad	mg/l BAP		A	B	C	D	E
PR 872080	0.00	5.02	A				
CP 722086	0.75	4.94	A	B			
CP 722086	0.45	4.91	A	B			
PR 872080	0.15	4.90	A	B			
CP 722086	0.60	4.86	A	B			
SP 792233	0.15	4.73	A	B	C		
SP 792233	0.30	4.71	A	B	C	D	
CP 722086	0.00	4.71	A	B	C	D	
CP 722086	0.30	4.62	A	B	C	D	E
CP 722086	0.15	4.61	A	B	C	D	E
PR 872080	0.30	4.58	A	B	C	D	E
SP 792233	0.45	4.58	A	B	C	D	E
SP 792233	0.60	4.37		B	C	D	E
PR 872080	0.45	4.26			C	D	E
SP 792233	0.00	4.20			C	D	E
SP 792233	0.75	4.19			C	D	E
PR 872080	0.60	4.16				D	E
PR 872080	0.75	4.07					E

* No existe diferencia significativa en medias con la misma letra.

Los tratamientos 0.15, 0.30, 0.45 y 0.60 mg/l de BAP, con las medias 4.90, 4.58, 4.26 y 4.16 hojas/brote, se consideran iguales en cuanto a la cantidad de hojas formadas. Estadísticamente estos tratamientos producen un número de hojas de una magnitud intermedia para dicha variedad, en la fase de multiplicación o evaluación de los tratamientos de BAP, a los 15 días después de la siembra.

ii. Variedad SP 792233, según la interacción variedad x BAP, para la variable número de hojas a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar

Para la variedad SP 792233, al utilizar la prueba de medias de Tukey, y como se indica en el cuadro 13, los tratamientos 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.00 y 0.75 mg/l de BAP, con las medias 4.73, 4.71, 4.58, 4.37, 4.20 y 4.19 hojas/brote, fueron estadísticamente iguales e intermedias en toda la fase que duró el experimento a los 15 días después de la siembra a la variable número de hojas.

Al analizar el tratamiento de 0.15 mg/l de BAP el cual fue alto en número de hojas 4.73 hojas/brote según la media, al compararlo con el tratamiento de 0.75 mg/l de BAP el cual produjo 4.19 hojas/brote, siendo para este caso el de menor diferenciación para dicha variable. De lo anterior se deduce que al elevar los niveles de BAP, se induce a un incremento de brotes, que por lo tanto la diferenciación de hojas se reduce, tal como lo indicó el análisis estadístico.

Dicha variedad de caña de azúcar, produjo la menor cantidad de hojas en un rango aproximado de 4.73 a 4.19 hojas/brote, lo mismo se debe a que el tamaño de sus brotes es sumamente pequeño como se observa en la figura 4, que por tal razón la diferenciación de hojas se reduce dificultando la toma de datos, como se puede observa en los tratamientos 0.45, 0.60 y 0.75 mg/l de BAP de la misma.

iii. Variedad CP 722086, según la interacción variedad x BAP a los 15 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar

Para el caso de la variedad de caña de azúcar CP 722086, los tratamientos evaluados 0.75, 0.45, 0.60, 0.00, 0.30 y 0.15 mg/l de BAP, estadísticamente son iguales, y a la vez de intermedia producción en cuanto al número de hojas en el experimento, a los 15 días después de la siembra, según lo indicó la prueba de medias de Tukey con 5% de significancia (Cuadro 13).

Podemos indicar que el tratamiento 0.75 mg/l de BAP, es el que tiene la media más alta con 4.94 hojas/brote para dicha variedad de caña de azúcar, y por lo tanto el nivel de BAP más alto. Por tal razón el incremento del regulador de crecimiento BAP en el medio de cultivo, indujo a una mayor producción de hojas para esta variedad, contrario, a los tratamientos evaluados para dicha

variable en las variedades PR 872080 y SP 792233, en donde los niveles elevados produjeron menor número de hojas/brote, lo cual se debió a la poca diferenciación de hojas en los brotes.

Para un caso muy particular, como es la variedad CP 722086, al existir más proliferación de brotes, el número de hojas tiende a incrementar, por lo tanto los niveles de bencilaminopurina como el 0.75, 0.45 y 0.60 mg/l de BAP, producen mayor división celular en el explante y por ende la inducción de la brotación es estimulada, es decir que al existir más brotes se incrementa el número de hojas por unidad experimental, lo cual se confirma con las medias estadísticas 4.94, 4.91 y 4.86 hojas/brote del presente experimento.

7.2.2 Evaluación de tratamientos de BAP, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

Para realizar la cuantificación de datos de las variables (número de brotes, longitud de brotes y número de hojas/brote) de estudio en las variedades CP 722086, SP 792233 y PR 872080, y conocer la respuesta de los explantes a los diferentes tratamientos de bencilaminopurina, se hizo necesario la evaluación de una segunda etapa, la cual se definió a los 30 días después de la siembra; se utilizó como explante un brote proveniente de la fase inicial, con un tamaño de 3 cms y grosor de 2-3 mm. El medio de cultivo se suplementó con la aplicación de los tratamientos de BAP, más cinetina a razón de 0.1ppm y ácido indolacético (AIA) a 0.01 ppm como auxina y 150 ppm de ácido cítrico como antioxidante.

En la misma fase de multiplicación, los explantes desarrollaron su máximo potencial de brotación lateral, lo cual dependió del nivel de BAP y del tiempo que permanecieron en el medio de cultivo. Con la finalidad de evaluar la bencilaminopurina en el presente estudio, se observó el comportamiento del explante en las tres variedades de caña de azúcar al final de los 30 días después de realizada la siembra.

7.2.2.1 Variable Número de Brotes, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

Para el caso de esta variable, después de los 30 días de realizada la siembra, los resultados obtenidos en el análisis de varianza, se puede observar que existe diferencia significativa para los factores: variedad y BAP, al igual que la interacción variedad x BAP, debido a

que el $Pr > F = 0.0031$ es menor al 5% de significancia (Cuadro 14), por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey (Cuadro 15) a la interacción variedad x BAP, siendo para éste caso el factor de interés.

Con lo referente al coeficiente de variación que fue 22.96%, se puede indicar que la variable número de brotes presentó heterogeneidad como era de esperarse en cada uno de sus valores de las tres variedades de caña de azúcar, el rango para ésta variable va de 4.32 a 24.90 brotes, a los 30 días después de la siembra.

Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$)}, CENGICAÑA 2003.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Variedad	2	32.83316451	16.41658226	24.01	0.0001 *
BAP	5	106.10997328	21.22199466	31.04	0.0001 *
Variedad x BAP	10	19.22841201	1.92284120	2.81	0.0031 *
Error	162	110.74460742	0.68360869		
Total	179	268.91615722			

C.V. = 22.96%

* Diferencias significativas (5%)

A. Variable número de brotes/explante, según la interacción variedad x BAP, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

De acuerdo a la prueba de Tukey, existe la separación en tres grupos de los tratamientos aplicados, presentando en el primer grupo a los tratamientos SP 792233x0.75 mg/l, PR 872080x0.75 mg/l y PR 872080x0.60 los cuales mostraron el mayor número de brotes/explante en dos de las tres variedades de caña en estudio. Siendo SP 792233 y PR 872080, con los niveles de 0.75 y 0.60 mg/l de BAP y con 24.90, 23.70 y 23.20 brotes/explante similares estadísticamente, (cuadro 15).

Como un segundo grupo aparecen los tratamientos PR 872080x0.30 mg/l, SP 792233x0.60 mg/l, PR 872080x0.45 mg/l, SP 792233x0.45 mg/l, PR 872080x0.15 mg/l, CP 722086x0.75 mg/l, CP 722086x0.60 mg/l, CP 722086x0.30 mg/l, CP 722086x0.45 mg/l, SP 792233x0.15 mg/l, SP 792233x0.30 mg/l, CP 722086x0.15 mg/l y PR 872080x0.00 mg/l de BAP, sin ninguna diferencia

estadísticamente significativa con lo que respecta al número de brotes, aquí las tres variedades de caña de azúcar SP 792233, PR 872080 y CP 722086 estadísticamente tienen en mismo efecto en algunos de los niveles de BAP aplicados al medio de cultivo.

Por último los tratamientos SP 792233x0.00 mg/l y CP 722086x0.00 mg/l de BAP que presentaron las menores medias y por lo consiguiente la menor cantidad de brotes, lo cual se debe a que son los tratamientos sin aplicación alguna de BAP en el medio de cultivo.

Cuadro 15. Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP, para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra.

Tratamiento		Media número de brotes	Agrupación de Tukey al 5%							
Variedad	mg/l BAP									
SP 792233	0.75	24.90	A							
PR 872080	0.75	23.70	A							
PR 872080	0.60	23.20	A	B						
PR 872080	0.30	19.90	A	B	C					
SP 792233	0.60	19.60	A	B	C					
PR 872080	0.45	19.30	A	B	C					
SP 792233	0.45	17.50	A	B	C	D				
PR 872080	0.15	16.40	A	B	C	D	E			
CP 722086	0.75	12.70		B	C	D	E			
CP 722086	0.60	12.20			C	D	E	F		
CP 722086	0.30	11.11			C	D	E	F	G	
CP 722086	0.45	10.44			C	D	E	F	G	
SP 792233	0.15	9.15				D	E	F	G	
SP 792233	0.30	8.01					E	F	G	
CP 722086	0.15	7.97					E	F	G	
PR 872080	0.00	5.00						F	G	
SP 792233	0.00	4.40							G	
CP 722086	0.00	4.32							G	

* No existe diferencia significativa en medias con la misma letra.

- a. Descripción de las variedades según la interacción variedad x BAP para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra**
- i. Variedad PR 872080, según la interacción variedad x BAP para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra**

De acuerdo al análisis realizado (Cuadro 15), los tratamientos 0.75 mg/l y 0.60 mg/l de BAP con una media de 23.70 y 23.20 brotes por explantes indican que son los mejores, por lo tanto,

con fines de propagación *in vitro* se puede utilizar cualquiera de los dos. Tienen igual efecto para dicha variedad, pero económicamente el tratamiento 0.60 mg/l de BAP se considera adecuado para la micropropagación.

Para el caso de los tratamientos 0.30 mg/l, 0.45 mg/l, 0.15 mg/l y 0.00 mg/l de BAP, con las medias 19.90, 19.30, 16.40, 5.00 brotes/explante, produjeron una cantidad similar de brotes por explante, pero bajo con respecto a uno de los mejores tratamientos (0.60 mg/l de BAP).

Analizando detalladamente el comportamiento de los tratamientos en este rango estadístico de 5.00 a 19.90 brotes/explante, observamos que el nivel que produce más brotes es el 0.45 mg/l de BAP y en caso contrario el tratamiento testigo sin la aplicación de BAP fue bajo con respecto a esta variable a los 30 días después de la siembra. Pérez Ponce, (31), al evaluar la micropropagación de caña de azúcar obtuvo hasta 10.94 brotes/planta, en el nivel más alto de BAP a razón de 0.30 mg/l a las cuatro semanas en un medio MS más cinetina. Esto coincide con lo recomendado por Sauvaire y Vasil (38, 43), que al añadir al medio de cultivo la citocinina "BAP" a razón de 0.10 mg/l e incrementar la dosis a 0.624 mg/l se obtenía el mayor número de brotes siempre en combinación con una auxina.

ii. Variedad SP 792233, según la interacción variedad x BAP para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra

Por medio de la prueba de Tukey (Cuadro 15), el tratamiento con el nivel de 0.75 mg/l de BAP fue el que produjo mayor número de brotes por explante y constituye el mejor. Dicha prueba mostró diferencia en los diferentes niveles de BAP con respecto a ésta variable en la variedad SP 792233 a los 30 días de realizada la siembra. Se observa que el mejor tratamiento se obtuvo con una media de 24.90 brotes/explante en el nivel 0.75 mg/l, con 20.50 brotes/explante más que el testigo, éste sin la aplicación de BAP al medio de cultivo el cual se considera como el de menor inducción a la brotación.

El análisis permitió la agrupación de los tratamientos, en los cuales se puede ver la diferencia significativa entre el mejor de los tratamientos como es el caso del nivel con 0.75 mg/l y entre un segundo grupo los tratamientos con los niveles de 0.60, 0.45, 0.15 y 0.30 mg/l de BAP y medias de 19.60, 17.50, 9.15 y 8.01 brotes/explante, y por último con una mínima respuesta, el tratamiento testigo, esto basado en la ausencia del inductor de la brotación.

La SP 792233 produjo un tamaño de brote sumamente pequeño y frágil en el nivel de 0.75 mg/l de BAP lo cual se considera una característica muy particular, pero al continuar con la fase de enraizamiento para realizar la aclimatación de los explantes, se corre el riesgo de una baja sobrevivencia, esto debido a la alta brotación que se obtuvo con el nivel 0.75 mg/l BAP, los cuales no son adecuados para iniciar una tercera fase de micropropagación.

iii. Variedad CP 722086, según la interacción variedad x BAP para la variable número de brotes, a los 30 días después de la siembra

Con lo que respecta a esta variedad, la proliferación de brotes fue intermedia sobre la base de ésta segunda etapa, a pesar de duplicar el tiempo de permanencia en el medio de cultivo (30 días en total), y fue baja con respecto a las variedades PR 872080 y SP 792233, como a la vez comparando el efecto del mismo tratamiento de BAP a una concentración de 0.75 mg/l, en donde éstas variedades indujeron el doble de brotación que la CP 722086 lo cual se evidencia en las medias que aparecen en el cuadro 15.

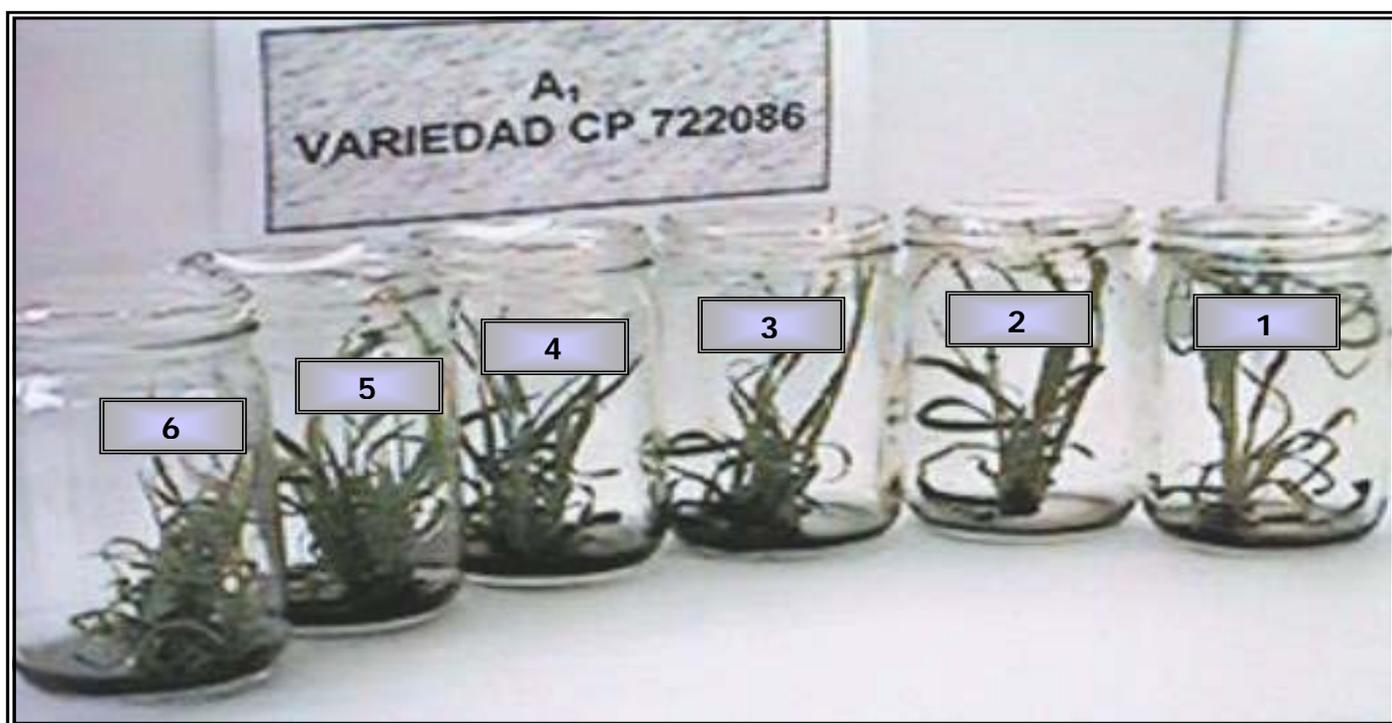


Figura 6. Efecto de los tratamientos de BAP en la variedad CP 722086, se observa la brotación, la longitud de los brotes y las hojas diferenciadas, a los 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003. (1= 0.00 mg/l, 2 = 0.15 mg/l, 3 = 0.30 mg/l, 4 = 0.45 mg/l, 5 = 0.60 mg/l y 6 = 0.75 mg/l de BAP)

Analizando los tratamientos de dicha variedad el nivel 0.75 mg/l, fue el que más indujo a la brotación con una media de 12.70 brotes/explante y el menor para éste caso el nivel 0.15 mg/l, pero dichos tratamientos son considerados iguales agrupadamente en cuanto a esta variable (Cuadro 15). Con respecto al tratamiento 0.00 mg/l de BAP, fue el menos adecuado en la inducción de brotes con una media de 4.32, la cual es la más baja de todo el experimento.

7.2.2.2 Variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar

En el análisis de varianza para la variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra de las variedades en estudio, los factores variedad y BAP, y a la vez la interacción variedad x BAP fue significativo al ANDEVA, debido a que los valores de $Pr > F = 0.0001$ y $Pr > F = 0.0005$ de los factores son menores al 5% de significancia (Cuadro 16).

Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \text{Log}(Y+1)$ }, CENGICAÑA 2003.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Variedad	2	2.81408408	1.40704204	104.49	0.0001 *
BAP	5	1.78678403	0.35735681	26.54	0.0001 *
Variedad x BAP	10	0.45535220	0.04553522	3.38	0.0005 *
Error	162	2.18147720	0.01346591		
Total	179	7.23769752			

C.V. = 9.06%

* Diferencia significativa (5%)

Se hace relevante el análisis y la discusión de la interacción variedad x BAP, lo cual se debe a que este factor interactúa con cada una de las variedades y los diferentes niveles de BAP. Además el coeficiente de variación para dicha variable fue de 9.06%, lo cual estadísticamente se considera aceptable debido a que los datos se comportaron de una manera homogénea indistintamente de la variedad de caña de azúcar.

A. *Variable longitud de brotes según la interacción variedad x BAP, a los 30 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar*

Por medio de la prueba de Tukey al 5% aplicada a los datos, se puede observar que la misma nos agrupa en tres distintos grupos de longitudes, siendo el tratamiento 0.00 mg/l de BAP con la mayor longitud de brotes de las tres variedades de caña en estudio, los cuales corresponden a las variedades PR 872080 y CP 722086. En ambas variedades los tratamientos testigo sin la aplicación de BAP, estadísticamente tienen una media de 4.36 y 3.12 cms/brote.

Como un segundo grupo integrado por los tratamientos PR 872080x0.15 mg/l, PR 872080x0.30 mg/l, PR 872080x0.45 mg/l, CP 722086x0.15 mg/l, PR 872080x0.60 mg/l, PR 872080x0.75 mg/l, SP 792233x0.00 mg/l, CP 722086x0.60 mg/l, CP 722086x0.45 mg/l, SP 792233x0.30 mg/l, CP 722086x0.75 mg/l, CP 722086x0.30 mg/l y SP 792233x0.15 mg/l de BAP, con las medias estadísticas 2.50, 2.35, 2.35, 2.21, 2.17, 2.11, 2.10, 2.05, 1.97, 1.84, 1.83, 1.82, 1.34 cm/brote, produjeron la misma longitud de brotes, por lo que estadísticamente se consideran iguales. Para el caso de los tratamientos con los resultados más bajos destaca la variedad SP 792233 en donde los niveles de BAP 0.45 mg/l, 0.60 mg/l y 0.75 mg/l produjeron la menor longitud de brotes, como se evidencia en el cuadro 17.

a. *Descripción de las variedades según la interacción variedad x BAP, para la variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra*

i. *Variedad PR 872080, según la interacción variedad x BAP, para la variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra*

En lo referente a esta variable (Cuadro 17), se indica que el tratamiento 0.00 mg/l, sin la aplicación del regulador de crecimiento BAP, produjo una de las medias más altas, 4.36 cm/brote de todo el experimento a los 30 días después de la siembra, mientras que con longitudes intermedias los tratamientos 0.15 mg/l, 0.30 mg/l, 0.45 mg/l, 0.60 mg/l y 0.75 mg/l de BAP y las medias 2.50, 2.35, 2.35, 2.17 y 2.11 cm/brote las cuales nos indican la forma proporcional y descendente de la longitud de los brotes de la variedad PR 872080, en este caso se hace notorio el efecto de los niveles de BAP en dicha variable.

Cuadro 17. Resumen de la variable longitud de brotes según la interacción variedad x BAP, a los 30 días después de la siembra.

Tratamiento		Media longitud de brotes (cm)	Agrupación de Tukey al 5%			
Variedad	Mg/l BAP					
PR 872080	0.00	4.36	A			
CP 722086	0.00	3.12	A	B		
PR 872080	0.15	2.50		B	C	
PR 872080	0.30	2.35		B	C	
PR 872080	0.45	2.35		B	C	
CP 722086	0.15	2.21		B	C	
PR 872080	0.60	2.17		B	C	
PR 872080	0.75	2.11		B	C	
SP 792233	0.00	2.10		B	C	
CP 722086	0.60	2.05			C	
CP 722086	0.45	1.97			C	D
SP 792233	0.30	1.84			C	D
CP 722086	0.75	1.83			C	D
CP 722086	0.30	1.82			C	D
SP 792233	0.15	1.34				D
SP 792233	0.45	1.10				D
SP 792233	0.60	0.92				E
SP 792233	0.75	0.90				E

* No existe diferencia significativa en medias con la misma letra.

El efecto de los niveles de BAP en la PR 872080, fue notorio, es decir que la misma es muy sensible a los cambios de nivel de BAP, de todo el experimento. Presentó con 0.75 mg/l de BAP una de las medias más altas en la producción de brotes y disminuyendo en el tratamiento testigo, lo anterior confirma que el testigo sin la aplicación de BAP produjo mayor diferenciación de hojas y que al existir BAP en el medio de cultivo esta disminuye debido a la proliferación de brotes, ya que a mayor brotación menor diferenciación de hojas.

ii. Variedad SP 792233, según la interacción variedad x BAP, para la variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra

En el cuadro 17, se presenta la prueba de medias según Tukey al 5% de significancia para dicha variedad de caña de azúcar, se observa que la longitud de brotes disminuye significativamente con respecto a las variedades PR 872080 y CP 722086, como se indica en los tratamientos 0.00 mg/l, 0.30 mg/l y 0.15 mg/l de BAP, los cuales la magnitud de sus medias 2.10, 1.84 y 1.34 cm/brote se redujo a una intermedia longitud en todo el estudio, esto a los 30 días después de la siembra y a la vez se consideran estadísticamente igual.

Dicha variedad presenta una tendencia definida a disminuir la longitud en los tratamientos 0.45 mg/l, 0.60 mg/l y 0.75 mg/l de BAP, los cuales presentan las medias de 1.10, 0.92 y 0.90 cm/brote. Es relevante mencionar el efecto que produce el BAP en la longitud de brotes, debido a que los niveles más altos de regulador disminuye la longitud. Podemos indicar que la característica que presentó esta variedad en el transcurso del estudio fue de producir brotes sumamente pequeños, delgados y aglomerados, lo cual se evidenció en la mayor proliferación de brotes del resto de variedades y como también de producir una longitud no adecuada para la etapa de enraizamiento (figura 4).

La longitud de brotes, es una variable que no presenta relevancia dentro del estudio en la fase de multiplicación, ya que se puede mejorar en las siguientes fases de subcultivo, esto se logra reduciendo el nivel de BAP a manera de disminuir la inducción multiplicativa y de tal manera obtener mayor desarrollo de los brotes.

iii. Variedad CP 722086, según la interacción variedad x BAP, para la variable longitud de brotes, a los 30 días después de la siembra

La prueba de Tukey realizada a los datos obtenidos de la variedad CP 722086 (Cuadro 17), agrupa los resultados en dos los cuales estadísticamente difieren entre sí. En el primer agrupamiento se determinó que el tratamiento sin la aplicación del BAP presentó la media más alta la cual fue de 3.12 cm/brote, a los 30 días después de la siembra. Como era de esperarse, sin la aplicación del regulador de crecimiento, la longitud de los escasos brotes fue alta, y como una segunda agrupación se concentran los tratamientos 0.15 mg/l, 0.60 mg/l, 0.45 mg/l, 0.75 mg/l y 0.30 mg/l de BAP, los cuales se ubican entre una intermedia longitud, según lo indican las medias 2.21, 2.05, 1.97, 1.83 y 1.82 cm/brote, en dichos tratamientos existió la disminución del largo de los brotes en todo el experimento, por tal razón cuando los niveles de BAP fueron altos existió un incremento en la brotación, pero se redujo la longitud.

Con fines de una multiplicación masiva esta variable es poco relevante, lo que interesa es una mayor brotación ya que se incrementaría la tasa de multiplicación para dicha variedad de caña de azúcar y esto se logra con altos niveles de BAP en el medio de cultivo. En la presente investigación se evidenció la escasa respuesta que presentó dicha variedad a los tratamientos con BAP en la proliferación de brotes. Para la longitud de brotes en el tratamiento testigo se obtuvo un

tipo de brote sumamente vigoroso, alto y adecuado para la etapa de enraizamiento y posterior aclimatación, con estas características se garantiza la sobrevivencia en invernadero.

7.2.2.3 Variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

Como se indica en el cuadro 18, el análisis de varianza para la variable de respuesta número de hojas, determinó diferencia significativa entre los factores variedad y en la interacción variedad x BAP. El factor BAP fue no significativo. Para la realización de la discusión de los resultados de la variable número de hojas fue relevante el análisis de la interacción variedad x BAP, debido a que el mismo es menor al grado de significancia, y a la vez que se detectó efectos diferenciales de los niveles de BAP sobre las variedades.

Cuadro 18. Análisis de varianza para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra {(con datos transformados, $Y' = \sqrt{Y+1}$), CENGICAÑA 2003.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Variedad	2	0.09749716	0.04874858	9.72	0.0001 *
BAP	5	0.03986643	0.00797329	1.59	0.1658 NS
Variedad x BAP	10	0.43589722	0.04358972	8.69	0.0001 *
Error	162	0.81259715	0.00501603		
Total	179	1.38585795			

C.V. = 3.51%

* Diferencia significativa (5%)

NS No significativo (> 5%)

El coeficiente de variación que presentó esta variable a los 30 días después de la siembra fue 3.51%, estadísticamente indica homogeneidad en los datos obtenidos por lo que se considera un manejo adecuado del estudio, además podemos decir que para la variable número de hojas en las tres variedades de caña de azúcar fue constante en un rango de 3.60 a 4.60 hojas por brote.

A. Variable número de hojas según la interacción variedad x BAP, a los 30 días después de la siembra en tres variedades de caña de azúcar

Con el uso de la prueba de Tukey y como lo indica el cuadro 19, se determinó para la variable número de hojas de cada una de las variedades de caña de azúcar, el mayor número de

hojas por brotes, destacándose los tratamientos SP 792233x0.75mg/l, PR 872080x0.00 mg/l y CP 722086x0.45 mg/l de BAP, con las medias las cuales presentan similar cantidad de hojas por brote: 4.60, 4.30 y 4.30/explante.

Se presenta una agrupación más con los tratamientos PR 872080x0.30 mg/l, CP 722086x0.60 mg/l, CP 722086x0.00 mg/l, CP 722086x0.30 mg/l, CP 722086x0.15 mg/l, CP 722086x0.75 mg/l, PR 872080x0.15 mg/l, PR 872080x0.45 mg/l, SP 792233x0.15 mg/l, PR 872080x0.60 mg/l, SP 792233x0.45 mg/l, SP 792233x0.30 mg/l, SP 792233x0.60 mg/l y PR 872080x0.75 mg/l de BAP, estadísticamente produjeron igual o similar número de hojas en las tres variedades en estudio, como a la vez se consideran de intermedia producción en el número de hojas. Para el caso del tratamiento SP 792233x0.00 mg/l de BAP, produjo el menor número de hojas a los 30 días después de la siembra, estadísticamente es considerado el menos adecuado para la propagación masiva, presentando una media estadística de 3.60 hojas/brote.

- a. Descripción de las variedades según la interacción variedad x BAP, para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra**
- i. Variedad PR 872080, según la interacción variedad x BAP, para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra**

Según la prueba de Tukey al 5% de significancia realizada a los datos obtenidos de la variable número de hojas (Cuadro 19), se evidencia una media de 4.30 hojas/brote sin la aplicación de BAP al medio de cultivo. Con la aplicación de la citocinina BAP y con sus diferentes niveles la diferenciación de hojas fue baja, lo cual se observa en los tratamientos con 0.30 mg/l, 0.15 mg/l, 0.45 mg/l, 0.60 mg/l y 0.75 mg/l de BAP, que estadísticamente, se ubican en un rango intermedio y se consideran iguales en base a las medias de 4.25, 4.04, 3.97, 3.93 y 3.85 hojas/brote en la fase de multiplicación.

Se hace notorio el efecto que presenta el BAP en el número de hojas en la variedad PR 872080, como se indica estadísticamente y a la vez se observa en la figura 5, en donde la diferenciación de hojas es levemente limitada dificultando a simple vista su cuantificación. El nivel de 0.75 mg/l de regulador es el que más brotación produjo, con una intermedia longitud de brotes 2.11 cms/brote y menor número de hojas. Al analizar el comportamiento de dicho nivel de BAP

vemos una respuesta adecuada para dividir las macollas y a la vez incrementar la tasa de multiplicación en dicha variedad de caña de azúcar.

Cuadro 19. Resumen de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), según la interacción variedad x BAP para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra.

Tratamiento		Media número de hojas	Agrupación de Tukey al 5%			
Variedad	mg/l BAP					
SP 792233	0.75	4.60	A			
PR 872080	0.00	4.30	A	B		
CP 722086	0.45	4.30	A	B		
PR 872080	0.30	4.25	A	B	C	
CP 722086	0.60	4.24	A	B	C	
CP 722086	0.00	4.22	A	B	C	
CP 722086	0.30	4.15		B	C	
CP 722086	0.15	4.13		B	C	
CP 722086	0.75	4.12		B	C	
PR 872080	0.15	4.04		B	C	
PR 872080	0.45	3.97		B	C	
SP 792233	0.15	3.96		B	C	
PR 872080	0.60	3.93		B	C	D
SP 792233	0.45	3.92		B	C	D
SP 792233	0.30	3.92		B	C	D
SP 792233	0.60	3.86			C	D
PR 872080	0.75	3.85			C	D
SP 792233	0.00	3.60				D

* No existe diferencia significativa en medias con la misma letra.

ii. Variedad SP 792233, según la interacción variedad x BAP, para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra

La prueba de Tukey (Cuadro 19) realizada a los datos de la variedad SP 792233 se determinó que presentó el mayor número de hojas en todo el experimento a los 30 días después de la siembra, en el tratamiento con 0.75 mg/l de BAP, y con una media de 4.60 cm/brote, el cual produjo una mayor estimulación a la diferenciación e incremento de dicha variable. Al contrario al tratamiento sin el regulador de crecimiento BAP, se redujo considerablemente el número de hojas, con la media de 3.60 cm/brote, la cual es baja de las tres variedades de caña de azúcar en estudio.

A nivel intermedio y sin diferenciación alguna los tratamientos 0.15 mg/l, 0.45 mg/l, 0.30 mg/l y 0.60 mg/l de BAP, con las medias de 3.96, 3.92, 3.92 y 3.86 cm/brote, estadísticamente

tienen igual cantidad de hojas por brote, pero menor al nivel con 0.75 mg/l de BAP y mayor al testigo.

Al analizar el comportamiento de dicha variedad en el nivel de BAP más alto 0.75 mg/l, indujo a un mayor número de brotes al igual que el número de hojas en todo el experimento, pero en la longitud de brotes se redujo considerablemente, siendo el que menor respuesta obtuvo. Podemos observar que esta variedad tiene una característica de brotes sumamente particular, produce brotes delgados, frágiles y en cantidad pero definidos en cuanto a hojas y tallos.

iii. Variedad CP 722086, según la interacción variedad x BAP, para la variable número de hojas, a los 30 días después de la siembra

Se determinó por medio de la prueba de Tukey al 5% de significancia (Cuadro 19), para la variable número de hojas, 30 días después de la siembra dos agrupaciones: en el primero se identificó al tratamiento con 0.45 mg/l de BAP presentando la media estadística más alta de 4.30 hojas/brote en la variedad CP 722086.

En una segunda agrupación se ubican los tratamientos 0.60 mg/l, 0.00 mg/l, 0.30 mg/l, 0.15 mg/l y 0.75 mg/l de BAP, los cuales estadísticamente tienen igual cantidad de hojas por brote, pero el tratamiento con 0.75 mg/l, siendo el más alto redujo la diferenciación de hojas, el cual presenta una media de 4.12 hojas/brote en relación al tratamiento 0.45 mg/l que presentó la media más alta de 4.30 hojas/brote.

El comportamiento de la CP 722086 a los diferentes niveles de BAP fue evidente, podemos indicar que el nivel con 0.75 mg/l, para la variable número de brotes produjo 12.70 brotes/explante, siendo la media más alta para dicha variedad, pero en las variables longitud y número de hojas, presentó las medias más bajas de todo el experimento a los 30 días después de realizada la siembra. Pero dicho nivel de BAP disminuyó la longitud como el número de hojas, esto en relación al tiempo que permaneció el explante en el medio de cultivo (30 días), pero se presentó el inconveniente de agotamiento del medio lo cual se debió a la proliferación de brotes.

7.2.3 Análisis de variables en función del tiempo de tres variedades de caña de azúcar

7.2.3.1 Variable número de brotes a los 15 y 30 días de realizada la siembra

A. Número de brotes/explante por variedad

Se observa en la figura 7, que la variedad CP 722086 produjo 5.83 brotes como promedio por explante a los 15 días después de la siembra, pero 15 días más existió un leve incremento de 3.96 brotes/explante, es relevante mencionar que la brotación para dicha variedad se incrementa mientras más tiempo permanece el explante en el medio de cultivo, pero se presenta el inconveniente de agotamiento del medio de cultivo, el cual se debe a la competencia por el mismo y el espacio, como a la vez por la liberación de compuestos fenólicos que afectan de tal manera la brotación que incide en la estimulación e inducción de brotes como se muestra en la figura 6. Con 9.79 brotes por explante, a los 30 días, la CP 722086 produjo la brotación más baja de las tres variedades en el presente estudio.

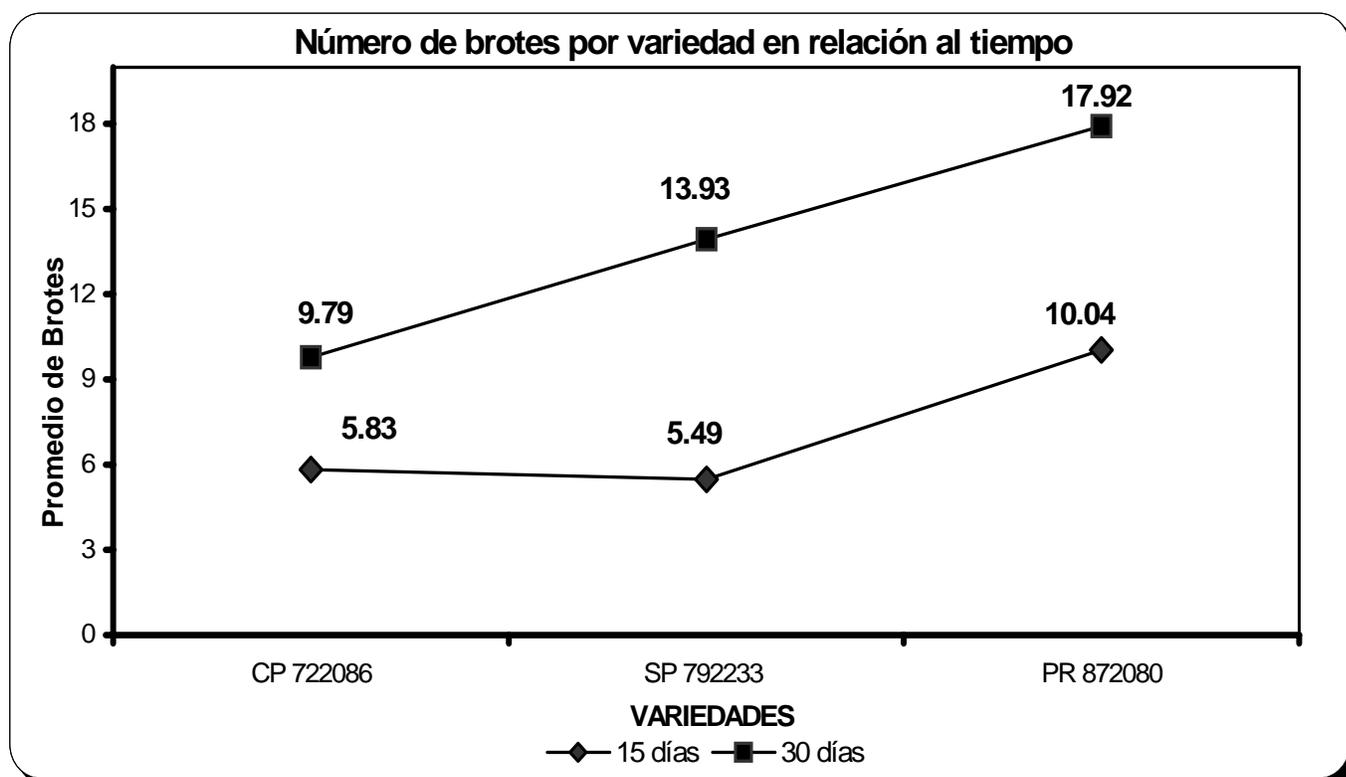


Figura 7. Promedio de brotes a los 15 y 30 días después de la siembra, en tres variedades de caña de azúcar, CENGICAÑA, 2003.

Con 5.49 brotes promedio por explante a los 15 días después de la siembra y 13.93 brotes a los 30 días, la variedad de caña de azúcar SP 792233, produjo un incremento de 8.44 brotes promedio en un lapso de 15 días, por tal razón ésta variedad se considera la de mayor producción de brotes en el tiempo de permanencia en el medio de cultivo. Pero sin embargo, y como se muestra en la figura 7, existe una producción intermedia de brotes a los 30 días, pero a los 15 días, la misma fue baja, con respecto a las dos variedades en estudio.

En la variedad PR 872080, la brotación fue de 10.04 brotes promedio por explante a los 15 días de realizada la siembra, para luego cuantificar 17.92 brotes promedio por explante sembrado a los 30 días. Con esta cantidad de brotes producidos se considera a dicha variedad como adecuada para la adaptación y multiplicación al cultivo *in vitro*. Como se observa en la figura 5, en la cual la calidad de los brotes y en donde la oxidación de los mismos es nula la cual la hacen satisfactoria para la tasa de multiplicación y posteriores fases de la micropropagación.

A la vez la misma PR 872080, en la figura 7, se muestra gráficamente la producción de brotes a los 15 días como a los 30 días, en donde se evidencia que en cada lapso de tiempo existió mayor promedio de brotes con respecto a la CP 722086 y SP 792233.

B. Número de brotes/explante en función del efecto del nivel de BAP

En la figura 7, puede observarse el comportamiento que tuvo cada uno de los niveles de BAP para esta variable, destacándose el nivel con una dosis de 0.75 mg/l, el cual presentó la mayor inducción a brotación en las tres variedades de caña de azúcar, a los 15 y 30 días después de la siembra. Con un promedio de 8.95 y 20.43 brotes/explante en los dos períodos, el nivel 0.75 mg/l de BAP se considera el mejor tratamiento para la fase de multiplicación de la caña de azúcar.

Cada 15 días se dio un incremento de 11.48 brotes/explante como promedio, el cual fue el más alto del resto de tratamientos evaluados (Figura 8).

Los niveles con 0.30 y 0.60 mg/l de BAP, estadísticamente no difieren en el número de brotes al igual que con 0.45 mg/l, pero podemos observar en la figura 8 que el nivel con 0.60 mg/l, disminuyó el número de brotes, esto a los 15 días después de realizada la siembra. Sin embargo, a los 30 días incrementó la brotación a 18.33, en base a esto podemos indicar que a más tiempo

de exposición de los explantes al medio de cultivo se incrementa el número de brotes, como se comprueba en los diferentes niveles de BAP del presente estudio.

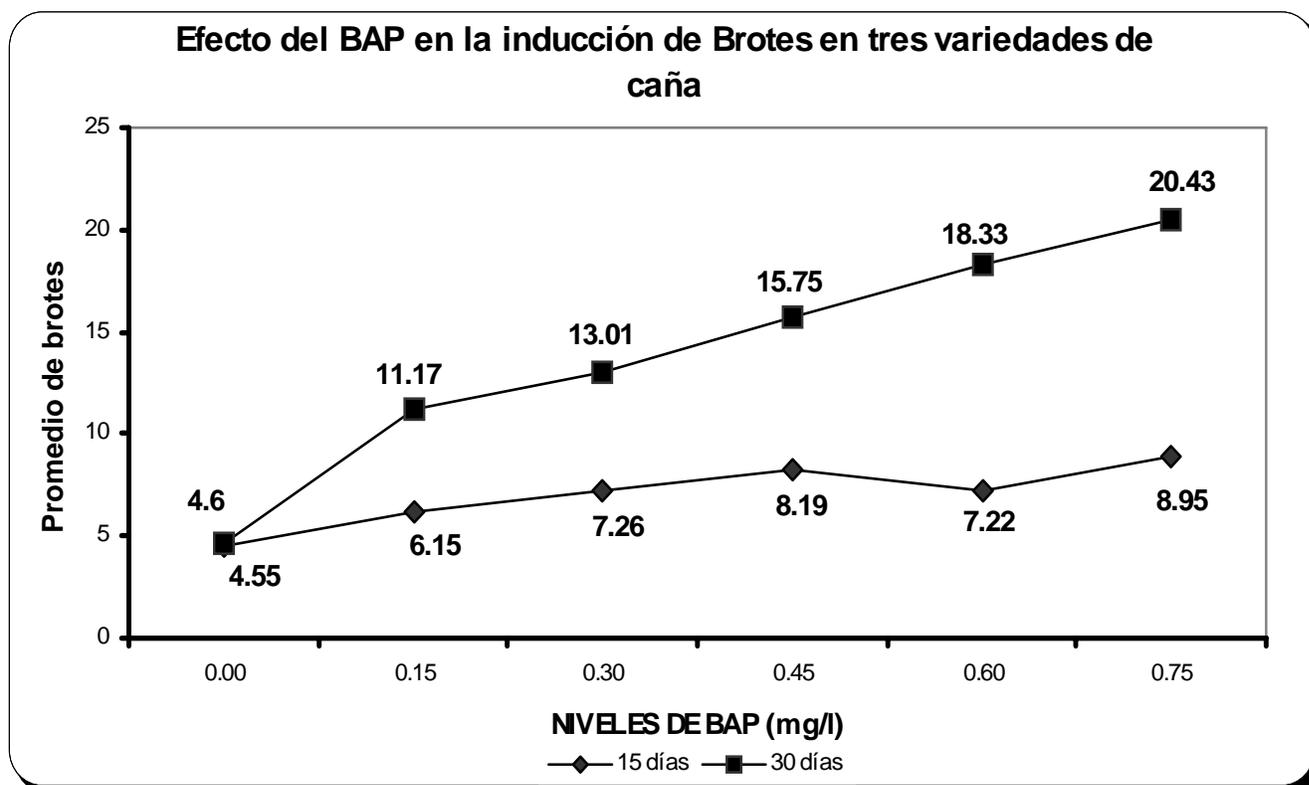


Figura 8. Efecto de la bencilaminopurina en la inducción de brotes en tres variedades de caña de azúcar a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.

El tratamiento testigo, sin el regulador de crecimiento en el medio de cultivo, estadísticamente no difiere en el tiempo ya que a los 15 como a los 30 días de realizada la siembra, el promedio se mantuvo constante de 4.55 a 4.60 brotes/explante.

7.2.3.2 Variable longitud de brotes a los 15 y 30 días de realizada la siembra

A. Longitud de brotes por variedad

El comportamiento de cada una de las variedades de caña de azúcar para la variable longitud de brotes en función del tiempo, observamos que la SP 792233 mostró una reducción ligera en la longitud de sus brotes a los 30 días de realizada la siembra con 1.37 cms/brote, pero sin embargo a los 15 días la longitud fue de 1.65 cms/brote, por tal razón se considera como la de menor longitud de brotes en todo el estudio, esta reducción se debió a un incremento en la

brotación (figura 9) en los diferentes niveles de BAP, aunado a la vez a la característica que presenta dicha variedad en los brotes los cuales son de tamaño pequeño y delgados (figura 4).

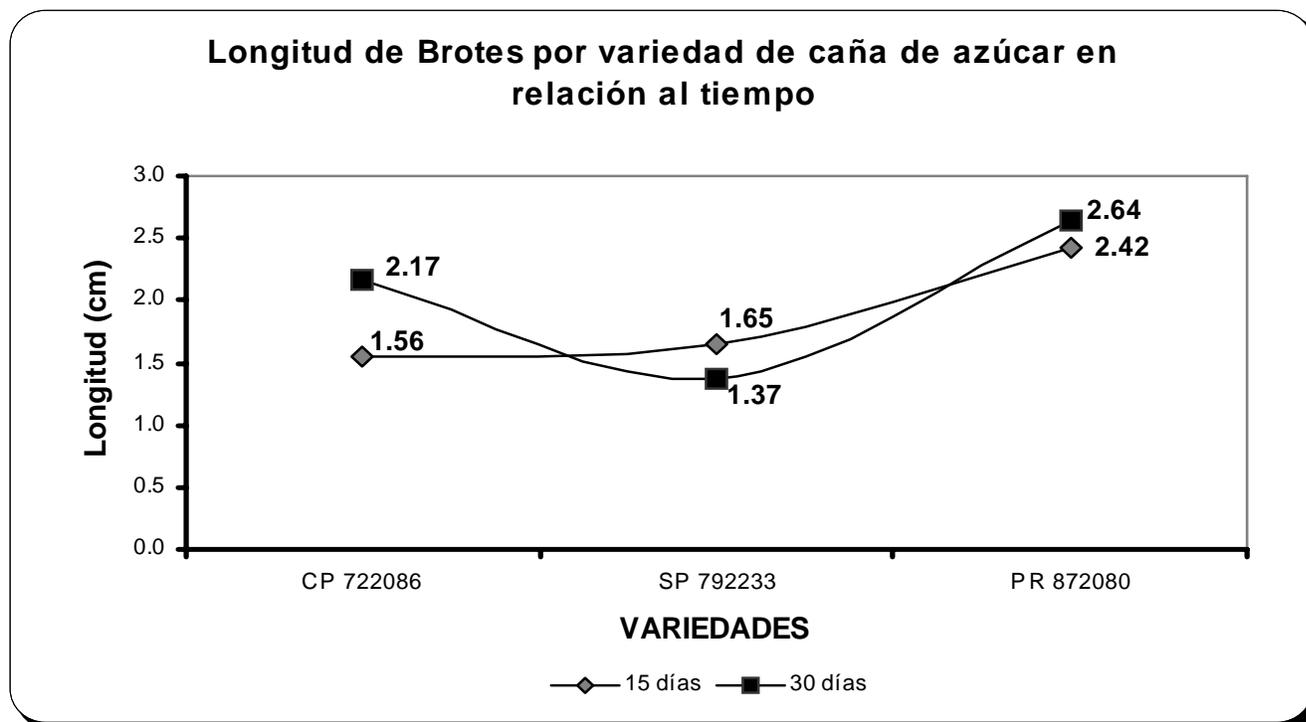


Figura 9. Longitud de brotes de tres variedades de caña de azúcar CP 722086, SP 792233 y PR 872880 a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.

La variedad CP 722086 a los 15 días presentó una longitud de 1.56 cm/brotes siendo la menor de todo el experimento, pero a los 30 días después de realizada la siembra los brotes alcanzaron una longitud de 2.17 cm, la cual estadísticamente se considera como la segunda mejor variedad en cuanto a longitud de brotes de todo el estudio.

Como lo muestra la figura 9, la variedad PR 872080 presenta la mayor longitud de brotes que la CP 722086 y SP 792233. Esta misma variedad a los 15 días presentó un promedio de 2.42 cm/brote y existió un ligero aumento a los 30 días el cual fue de 2.64 cm/brote.

B. Longitud de brotes en función del efecto del nivel de BAP

En la figura 10, se observa el efecto de los niveles de BAP en la variable longitud de brotes en tres variedades de caña de azúcar, en donde el tratamiento testigo sin BAP (0.00 mg/l) a los 15 como a los 30 días de realizada la siembra, presentó la mayor longitud de brotes (2.37 y 3.19

cm/brote). Se considera una altura adecuada para la micropropagación en las fases de enraizamiento y aclimatación de plántulas, pero dicho nivel no es adecuado para propiciar una multiplicación masiva de la caña de azúcar.

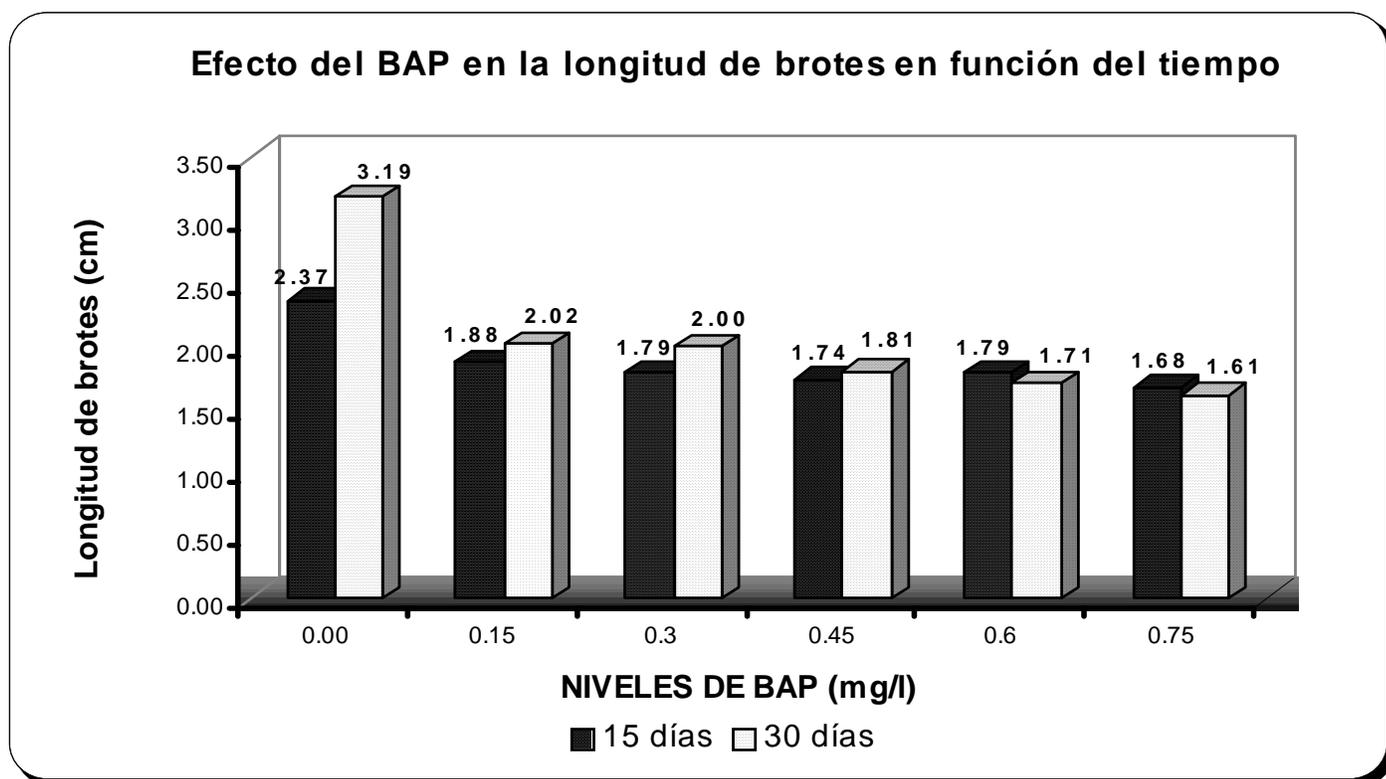


Figura 10. Efecto de la bencilaminopurina en la longitud de brotes en tres variedades de caña de azúcar a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.

En la grafica también se observa una disminución de la variable longitud de brotes a los 15 y 30 días después de la siembra en los diferentes niveles de BAP aplicados al medio de cultivo. Para el caso del nivel con 0.75 mg/l de BAP la longitud de brotes mostró entre 1.68 y 1.61 cm/brote a los 15 y 30 días, respectivamente. Con este rango de longitud se presenta el inconveniente de producir brotes susceptibles a una alta mortandad en las posteriores fases de cultivo de tejidos, ya que para las mismas se requiere de brotes vigorosos lo cual va relacionado con la altura.

Este problema se puede superar realizando subcultivos y reduciendo la concentración de BAP a manera disminuir la inducción de brotes para obtener mayor desarrollo.

Algo de resaltar en el tratamiento con 0.60 mg/l de BAP, este produjo similar longitud de brotes que el de 0.30 mg/l de BAP, lo cual se debe a que dicho nivel redujo su efecto en la brotación a los 15 días después de realizada la siembra ya que al existir mayor brotes la longitud de los mismos disminuyó. En base a lo anterior, se puede decir que la longitud de brotes esta relacionado en la cantidad de brotes que se obtenga de cada variedad de caña de azúcar.

7.2.3.3 Variable número de hojas a los 15 y 30 días de realizada la siembra

A. Número de hojas/brote por variedad

Se puede observar el comportamiento de las tres variedades de caña azúcar en relación al número de hojas por brote (Figura 11), la CP 722086 estadísticamente produjo el mayor número de hojas de todo el experimento a los 15 y 30 días después de la siembra. Gráficamente se observa una disminución de 4.78 a 4.19 hojas/brote a los 30 días, lo cual se debe aun leve incremento en el número de brotes (Figura 7), razón por la cual la diferenciación de hojas es afectada por el regulador de crecimiento y el tiempo de permanencia del explante en el medio de cultivo, se indica a la vez que a mayor exposición del material vegetal a los tratamientos se estimula la brotación, dificultando hasta cierto punto la cuantificación de hojas.

La variedad SP 792233 presentó en los dos períodos de tiempo el menor número de hojas/brote del resto de variedades, se observa una disminución de 4.46 a 3.98 hojas/brote a los 30 días de realizada la siembra.

Estadísticamente la variedad PR 872080, se agrupa en un rango intermedio en cuanto a dicha variable, a los 15 días de la siembra produjo 4.50 hojas/brote la cual fue mayor a la variedad SP 792233 pero menor a la CP 722086. A los 30 días disminuyó la capacidad de diferenciación foliar a 4.06 hojas/brote pero los rangos con respecto a las otras variedades fue constante, lo cual se debió a un aumento en el número de brotes por unidad.

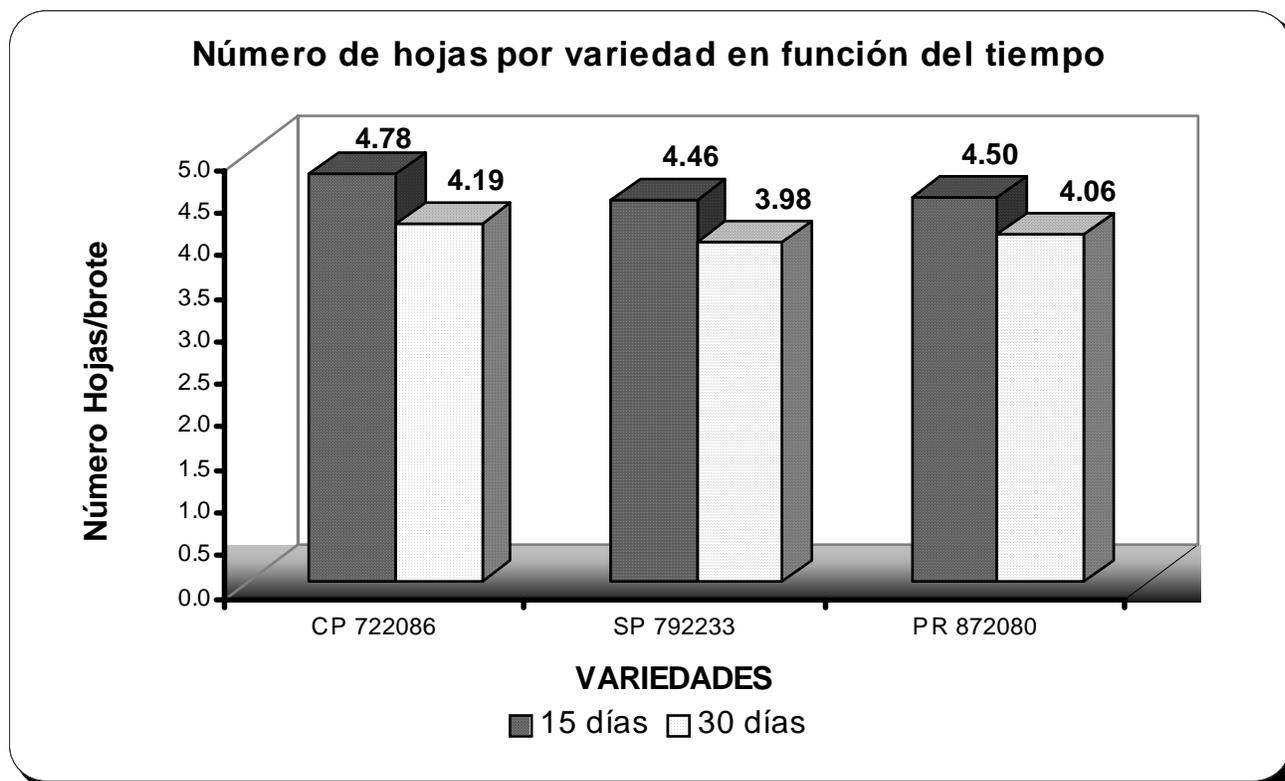


Figura 11. Número de hojas por brote de tres variedades de caña de azúcar CP 722086, SP 792233 y PR 872880 a los 15 y 30 días después de la siembra, CENGICAÑA, 2003.

El rango establecido estadísticamente para la producción de hojas en las tres variedades de caña de azúcar va de 4.06 a 4.78 hojas/brote, al final de los 30 días que duró el estudio.

B. Número de hojas/brote en función del efecto del BAP

En la figura 12, se observa el efecto de los diferentes niveles de BAP y el testigo en las tres variedades de caña de azúcar. En donde el tratamiento testigo sin regulador de crecimiento tiene un promedio de 4.64 hojas/brote al igual que nivel con 0.30 mg/l de BAP.

El nivel con 0.15 mg/l produjo el mayor número de hojas del resto de tratamientos con 4.75 hojas/brote. Los niveles con 0.45, 0.60 y 0.75 mg/l de BAP muestran una tendencia a la disminución del número de hojas/brote. Siendo éste último, con un promedio de 4.40 hojas/brote el de menor respuesta a los 15 días después de la siembra.

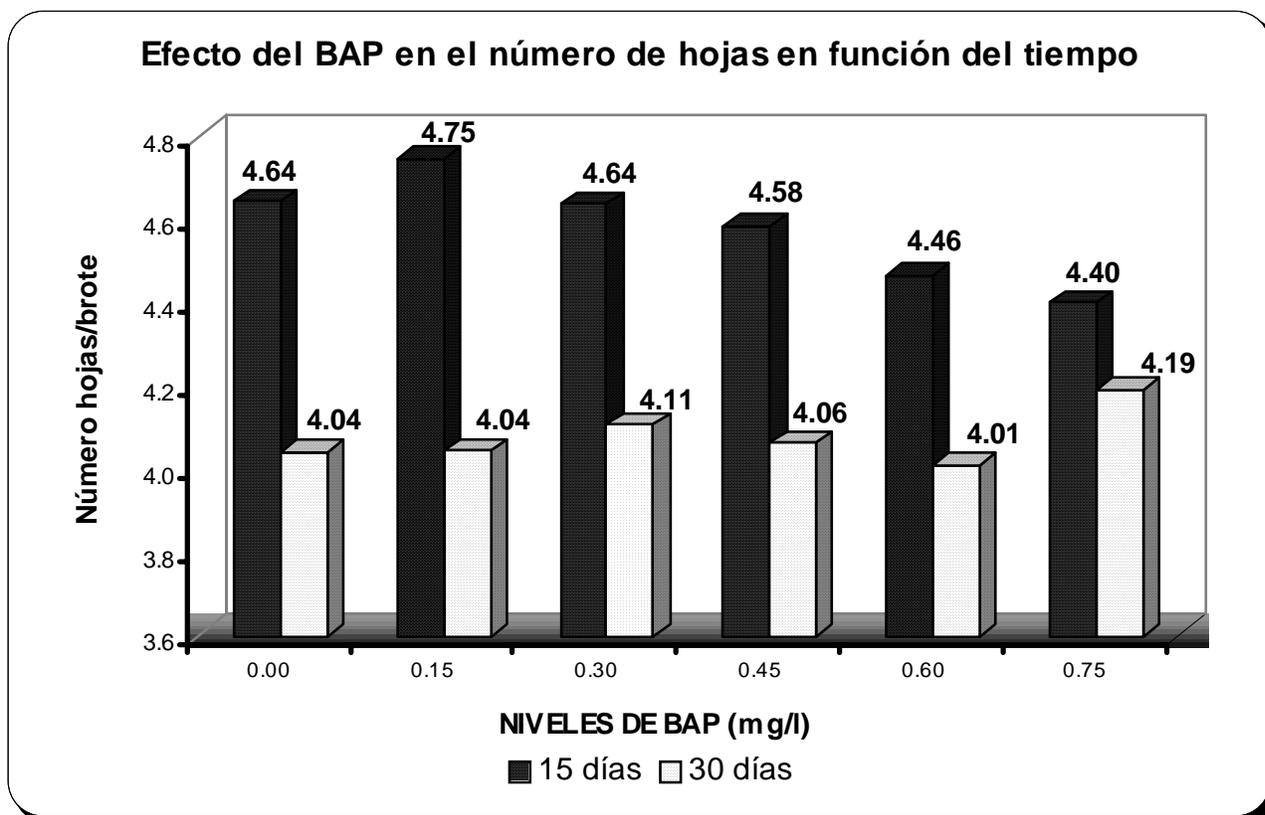


Figura 12. Efecto de la bencilaminopurina en el número de hojas por brotes en tres variedades de caña de azúcar a los 15 y 30 días después de la siembra.

A los 30 días después de la siembra se observa una disminución evidente en el número de hojas. Se identificó al nivel con 0.75 mg/l de BAP el cual produjo el mayor número de hojas/brote (4.19).

El nivel, sin regulador de crecimiento BAP (testigo) y con 0.15 mg/l de BAP, produjeron similar número de hojas con 4.04 hojas/brote, ambos en la inducción de brotes se consideran de respuesta baja, los cuales para fines de multiplicación masiva no son adecuados.

8. CONCLUSIONES

1. El genotipo es un factor que ejerce influencia en la brotación, y en la longitud de las variedades de caña de azúcar, en donde se evidencia a la variedad SP 792233 con una longitud y diferenciación de hojas menor a PR 872080 y CP 722080, y a esta última con una escasa respuesta a la brotación en todo el estudio, podemos decir que las variables de respuesta mostraron un comportamiento diferente en cada una de las variedades.
2. El uso de ácido indolacético a 0.01 mg/l como auxina y cinetina a 0.1 mg/l combinados con la 6-bencilaminopurina, provocan un efecto de sinergismo que estimulan la brotación en las variedades de caña de azúcar estudiadas, además para evitar el ennegrecimiento de los explantes el uso de ácido cítrico a 150 ppm como antioxidante en las fase de iniciación y multiplicación se hace necesario.
4. La variedad de caña de azúcar PR 872080, presentó el mayor número de brotes a los 15 y 30 días después de la siembra con 10.04 y 17.92 brotes por explante, seguida de la SP 792233 a los 15 días 5.49 brotes/explante, a los 30 días después de la siembra 13.93 brotes/explante y con una menor respuesta a la inducción de la brotación la variedad CP 722086 con 5.83 y 9.79 brotes/explante.
5. El nivel 0.75 mg/l de BAP, presentó el promedio más alto a los 15 y 30 días después de la siembra, con 8.95 y 20.43 brotes/explante, comparado con el nivel 0.00 mg/l el promedio fue constante 4.55 y 4.60 brotes/explante en los dos períodos del estudio en las tres variedades de caña.
6. En lo referente a la longitud de brotes la variedad PR 872080 presentó en los dos períodos un promedio de 2.42 y 2.64 cm/brote, estadísticamente se consideró la más alta de todo el estudio, como una segunda mejor altura la presenta la CP 722086 con 1.56 y 2.17 cm/brote, mientras que la SP 792233 con 1.37 y 1.65 cm/brote.

7. La longitud de brotes esta relacionada con la brotación que presentan las variedades. El nivel 0.00 mg/l de BAP siendo el testigo que presentó la mayor longitud con 2.37 y 3.19 cm/brote a los 15 y 30 días respectivamente, mientras que con la aplicación de BAP en el medio de cultivo existió una disminución en la longitud, pero la brotación se incrementó.
8. La variedad CP 722086 con un promedio de 4.19 a 4.78 hojas/brote fue la que presentó el mayor número de hojas diferenciadas, como una segunda mejor producción de hojas la PR 872080 con 4.06 y 4.50 hojas/brote y la SP 792233 con 4.46 a 3.98 hojas/brote siendo la que presentó el menor número de hojas a los 15 y 30 días después de la siembra.
9. A los 15 días después de la siembra se diferenció el mayor número de hojas en cada nivel de BAP, pero conforme la concentración se incrementó el número de hojas/brote se redujo. El nivel 0.15 mg/l BAP produjo la mayor diferenciación de hojas con 4.75 hojas/brote, pero a los 30 días la misma fue menor, además el nivel con 0.60 mg/l BAP con 4.01 hojas/brote fue el que produjo la menor diferenciación.

9. RECOMENDACIONES

1. Suplementar al medio de cultivo ácido indolacético a 0.01 y cinetina a 0.1 mg/l con 6-bencilaminopurina más ácido cítrico a razón de 150 ppm como antioxidante, para se induzca a un mayor efecto en la brotación y control en la oxidación de los explantes
2. Utilizar 0.75 mg/l de BAP en la variedad PR 872080 para obtener un proceso satisfactorio de una multiplicación masiva.
3. Para la multiplicación masiva de brotes de la SP 792233, se recomienda utilizar 0.75 mg/l de BAP, pero en las siguientes fases de la micropropagación como el enraizamiento y posterior aclimatación, se sugiere reducir la concentración del BAP con la finalidad de obtener un tamaño de brote adecuado.
4. Con fines de multiplicación masiva se recomienda el uso de 0.75 mg/l de BAP en la variedad CP 722086 y continuar con estudios para establecer el procedimiento adecuado para obtener la proliferación de brotes y una propagación satisfactoria a través de cultivo de tejidos.
5. Se sugiere continuar con investigaciones sobre posibles efectos adversos que pueda causar el uso del BAP al final de cada subcultivo, en las tres variedades de caña de azúcar, en particular si se emplean niveles de 6-bencilaminopurina altos a los evaluados en el presente estudio.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Amador, D. 1999. Curso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Programa de estudios de postgrado, Maestría en biotecnología de plantas. 38 p.
2. Amaya, EA; Cock, JH; Hernández, A; Irvine, JE. 1995. Biología de la caña de azúcar. *In* Cassalet, C; Torres, J; Isaacs, C. 1995. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Cali, Colombia, Cengicaña. p. 31-62.
3. Barba, RC; Zamora, AB; Mallion, AK; Linga, CK. 1978. Sugar cane tissue culture reseach. Congress International Society of Sugar Cane Technologist (16., 1977, Brasil). Proceedings. Brasil. p. 1843-1864.
4. Barceló Coll, J; Nicolás Rodrigo, G; Sabater García, B. 1995. Fisiología vegetal. 7 ed. España, Pirámide. p. 390-403.
5. Bidwell, RGS. 1983. Fisiología vegetal. Trad. por Guadalupe Jerónimo Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México, AGT Editor. 784 p.
6. Cambara Vazquez, P. 1998. Evaluación de la respuesta de tres variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), a la propagación *in vitro*, utilizando explantes apicales y dos sustancias antioxidantes: ácido cítrico y carbón activado, en tres concentraciones cada una. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 45 p.
7. Carrillo-Castañeda, G; Vargas, M; Vargas-Villanueva, M. 1986. Cultivo *in vitro* de *Saccharum officinarum* L. II. efecto de la especialización sobre la rediferenciación. Turrialba 36(4):533-540.
8. CENGICAÑA (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar, GT). 1997. Estudio semidetallado de los suelos en la zona cañera de Guatemala. Guatemala. Anexo 1, 137 p.
9. Córdova, CV. 1976. Fisiología vegetal. España, Rosario. 439 p.
10. Cronquist, A. 1986. Botánica básica. Trad. por Antonio Ambrosio. México, CECSA. 655 p.
11. Cruz Sic, M. 2000. Diagnóstico sobre el uso de vitroplantas en la agroindustria azucarera de Guatemala. Informe EPSA. Guatemala, USAC. 27 p.

12. Cruz Sic, M. 2000. Servicios realizados en el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, CENGICANA. Informe EPSA. Guatemala, USAC. 46 p.
13. Devlin, RM. 1980. Fisiología vegetal. Trad. por Xavier Llimona. España, Omega. 517 p.
14. Dookun, A; Moutiz, M; Autrey, LJJ. 1995. International society of sugar cane technologist. biology program preprints. US, ISSCT. p. 43-48.
15. George, EF. 1993. Plant propagation by tissue culture; part 1: the technology. 2 ed. US, Exegetics. 574 p.
16. Hartman, HT; Dester, DE. 1989. Propagación de plantas; principios y prácticas. Trad. por Antonio Marino Ambrosio. México, CECOSA. 760 p.
17. Hurtado, M. D., Merino, M. E. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales. México D. F. Trillas. 232 p.
18. López Morales, C. 1999. Efecto de la bencilaminopurina (BA) y dos métodos de micropropagación sobre los cultivares de plátano (*Musa balbisiana* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 75 p.
19. Méndez Salas, R. 1986. Propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) como técnica de apoyo para el mejoramiento genético. Agricultura Técnica Mexicana 12(2):215-229.
20. Merck Index. 1996. Encyclopedia of chemicals, and biological. NJ, US, Susan. Whitehouse Station. 470 p.
21. Murashige, T ; Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
22. Nand Lal, GS. 1994. Sugar cane. India, Breeding and Research Institute. p. 3-5.
23. Okabe, K. 1997. Informe 1995-1997; región I. Barcenas, Villa Nueva, Guatemala, s.e. 80 p.
24. Orozco, C. 1996. Cultivo de tejidos y su aplicación en agricultura. *In* Simposio nacional sobre cultivo de tejidos vegetales (1., 1996, Guatemala). Memorias. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. p. 1-10.

25. Orozco, H; Soto, G. 1996. Morfología de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) importantes en Guatemala y de variedades en evaluación regional grupo CGVO. Guatemala, CENGICAÑA. 43 p. (Documento Técnico no. 7).
26. Orozco, H; Soto, G. 1997. Pureza genética de la variedad de caña de azúcar CP 722086 en plantaciones comerciales en Guatemala y sus efectos en tonelaje y producción de azúcar. Guatemala, CENGICAÑA. 42 p. (Documento Técnico no. 10).
27. Orozco, H; Soto, G; Ceballos, L. Diferenciación morfológica de variedades de caña de azúcar en expansión comercial en la agroindustria azucarera de Guatemala. Sin publicar.
28. Orozco, H; Soto, GJ; Linares, E. 1995. Evaluación de tres distanciamientos de siembra de plántulas provenientes de yemas extraídas comparadas con el método convencional, en la variedad CP 722086. Guatemala, CENGICAÑA. 18 p. (Doc. Técnico no. 4).
29. Ovalle, C. 1996. Evaluación de cuatro dosis de Bencilaminopurina para la propagación *in vitro* de la vr. de plátano criollo amarillo (*Musa ABB*) en Guatemala. Tesis In. Agr. Guatemala, Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Agrícolas. 47 p.
30. Perea Dallos, M; Navarro Álvarez, W. 1988. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. Colombia, Universidad Nacional de Colombia. p. 8-14.
31. Pérez Ponce, J. 1993. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. In Roca, WM; Mrozinski, LA. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. Colombia, CIAT. p. 545-573.
32. Pocasangre, L. 1993. Manual de micropropagación de plátano banano. San Pedro Sula, Honduras, Fondo Hondureño de Investigación Agrícola. 53 p.
33. Purseglove, JW. 1972. Tropical crops; monocotyledons. England, Longman Group. p. 214-256.
34. Roca Canet, CE. 1996. Respuesta de dos diferentes tipos de explante de zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) a diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 79 p.
35. Rojas Garcidueñas, M; Ramírez, H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas. 2 ed. México, Limusa. p. 34-35.
36. Shukla, R; Khan, AQ; Garg, K. 1994. *In vitro* clonal propagation of sugarcane: optimization of media and hardening of plants; sugar cane. Great Britain, Printall. p. 22-23.

37. Sigma. 1990. Plant cell culture. US. 92 p.
38. Suavaire, BL. 1995. Influence of meristem tip size and location on morphological development in *Dioscorea cayenensis* – *D. rotundata* complex. Grose Caille and genotype of *D. praeheasilis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 42:215-218.
39. Thiman, KU. 1963. Plant growth substances: past, present and future. Ann. Rev. Plant Physiol. 14:1-8.
40. Tovar, R; Ardí, I. 1996. Efecto del ácido cítrico y el dithiothreitol sobre la oxidación en la iniciación de ápices vegetativos de caña de azúcar. In Coloquio de Biotecnología de las Plantas (4., 1996, El Salvador). Resúmenes. Santa Clara, El Salvador, UCLV. p. 5.
41. Usui, K; Okabe, K. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA-JOCV. 166 p.
42. Varga, A; Thomas, IH; Hruisma, J. 1988. Effects of auxins and cytokinins on epigenetic in stability of callus-propagated *Kalanchoe blossfeldiana* poelln. Plant. Cell. Tissue and Organ. Culture 15:223-231.
43. Vasil, IK. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. In Lurquin, PF; Kleinhofs, A. 1983. Genetic engineering in eukaryotes. UK, Plenum Publishing. p. 233-252.
44. Villalobos, I; Arias, O. 1987. Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Agronomía Costarricense no. 2:245-250.
45. Villalobos, R. 1990. Fundamentos técnico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Centro de Genética. 190 p.
46. Viveros, CA; Cassalett, C. 1994. Posible nueva tecnología para la siembra de caña de azúcar. Colombia, Cenicaña. p. 48-64.
47. Weaver, RJ. 1985. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. por Agustín Contín. México, Trillas. 262 p.
48. Wenman, CM; Morar, HB. 1992. Review of the triangle ethanol plant and its effects on the sugar mil. Zimbabwe, African Sugar Technologist Association. p. 127-132.

11. APÉNDICE

Cuadro. 20. A Equipo y cristalería usados para la realización del estudio.

Instrumentos	Equipo	Cristalería
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mechero de alcohol, para flamear instrumentos. ➤ Pipetas. ➤ Pinzas grandes y pequeñas. ➤ Agujas de disección. ➤ Tijeras. ➤ Espátulas. ➤ Mangos para bisturís. ➤ Hojas de bisturís. ➤ Pizetas ➤ Recipientes de plásticos. ➤ Papel parafilm. ➤ Papel filtro. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Una unidad de cámara de flujo laminar. ➤ Autoclave. ➤ Balanza analítica. ➤ Estufa-Agitador. ➤ Agitadores magnéticos. ➤ Refrigeradora. ➤ Potenciómetro. ➤ Microondas. ➤ Horno de esterilización en seco. ➤ Carretilla de transporte 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Beaker. ➤ Erlenmeyer. ➤ Tubos de ensayo. ➤ Balones aforados. ➤ Recipientes para guardar soluciones concentradas. ➤ Recipientes con capacidad de 200 ml, para medios de cultivo. ➤ Pipetas graduadas. ➤ Cajas de petrí esterilizadas. ➤ Recipientes de vidrio para los medios de cultivo.

Cuadro. 21. A Reactivos e insumos utilizados para la realización del cultivo *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar.

Reactivos	Otros
<ul style="list-style-type: none"> ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ✓ KNO_3 ✓ NH_4NO_3 ✓ KH_2PO_4 ✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ✓ KI ✓ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ✓ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ✓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ✓ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ✓ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ✓ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ✓ H_3BO_3 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ✓ Myo-inositol ✓ Ácido indolacético ✓ 6-Bencilaminopurina ✓ Cinetina ✓ Ácido nicotínico ✓ Piridoxina-HCl ✓ Thiamina-HCl ✓ Glicina. ✓ Ácido cítrico. ✓ Ácido ascórbico. ✓ Sacarosa. ✓ Agar.