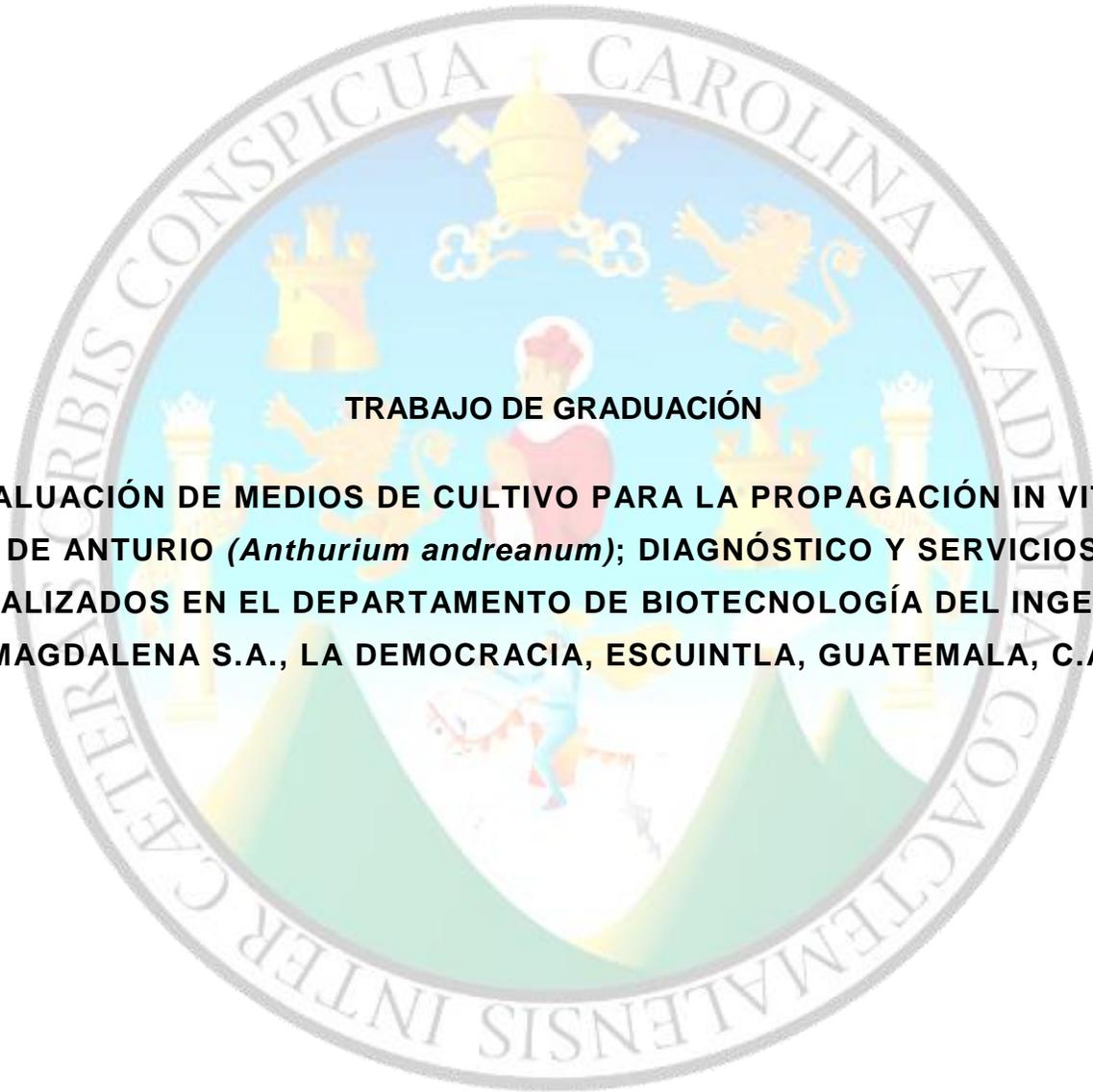


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ÁREA INTEGRADA**



**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO  
DE ANTURIO (*Anthurium andreanum*); DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS  
REALIZADOS EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INGENIO  
MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.**

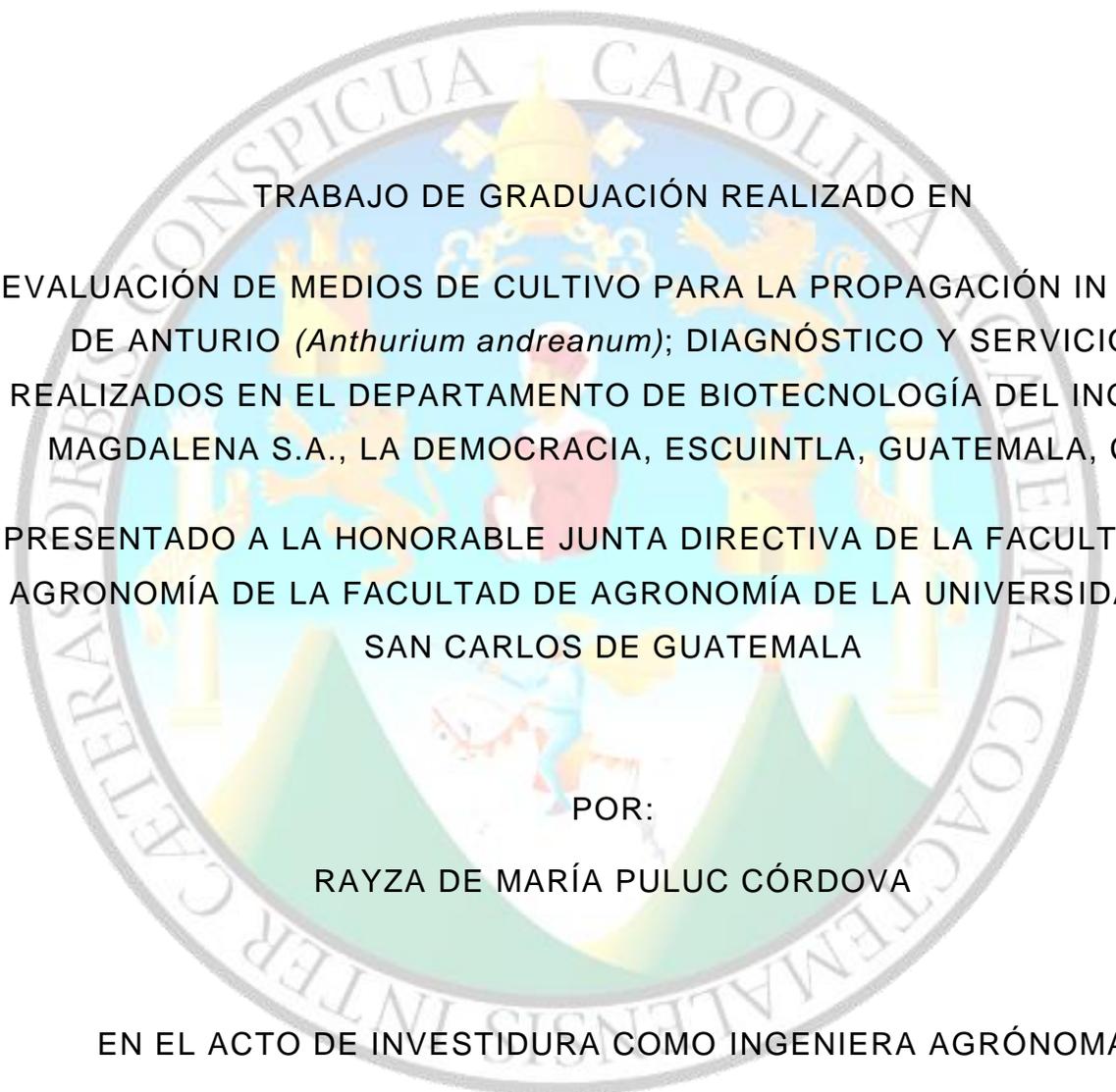
**RAYZA DE MARÍA PULUC CÓRDOVA**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE 2015**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ÁREA INTEGRADA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or religious figure, seated on a throne. The figure is surrounded by a blue and gold border. The Latin text "UNIVERSITAS SAN CAROLINIENSIS" is visible at the top, and "CIVITATIS GUATEMALENSIS" is at the bottom. The seal is semi-transparent and serves as a background for the text.

TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN  
EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO  
DE ANTURIO (*Anthurium andreanum*); DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS  
REALIZADOS EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INGENIO  
MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.  
PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR:

RAYZA DE MARÍA PULUC CÓRDOVA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO INGENIERA AGRÓNOMA  
EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADA

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

Dr. Carlos Guillermo Alvarado

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA,

DECANO	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
VOCAL I	Dr. Tomas Antonio Padilla Cambara
VOCAL II	Ing. Agr. Cesar Linneo García Contreras
VOCAL III	Ing. Agr. MSc. Eberto Raúl Alfaro Ortiz
VOCAL IV	P. Agr. Josué Benjamín Boche López
VOCAL V	Mta. E. H. Rut Raquel Curruchich Cumez
SECRETARIO	Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2015

Guatemala, noviembre de 2015

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

Honorables 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 graduación titulado EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE ANTURIO (*Anthurium andreanum*); DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A., como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Rayza de Maria Puluc Córdova

## **ACTO QUE DEDICO**

- A Dios:** Por su infinito amor y su fidelidad, porque aun conociendo todos mis defectos me ha bendecido a lo largo de mi carrera, porque en secreto me ha fortalecido y me ha dado ánimos para seguir adelante cada día. Este triunfo no es mío, sino tuyo Papá.
- A mis padres:** Aura Marina Córdova Gómez y Juan José Puluc Vásquez, por cada esfuerzo y sacrificio realizado, porque sé que este trayecto no ha sido fácil, pero ahora puedo decir que juntos hemos llegado a la meta de lo que apenas inicia. Los amo grandemente.
- A mis hermanos:** Aury Montserrat y Johann Emmanuelle, por su apoyo, amistad y cariño.
- A mi novio:** Marito, por su apoyo incondicional, por sus palabras de ánimo en momentos difíciles y los triunfos compartidos a lo largo de nuestra carrera, por ser mi mejor amigo.
- A mis amigos:** Luis Meyer, Sari Galindo y Mafer Mayorga, por esos momentos de alegría, risas, llantos, preocupaciones; pero sobre todo por su amistad incondicional.
- A mis centros de estudio:** A la Escuela Nacional Central de Agricultura y a la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios:** Por su apoyo y consuelo espiritual, por guiar mis pasos y cuidar siempre de mí, por sus propósitos de amor y sus promesas cumplidas en mi vida. Gracias por todo Papito.

**A mi familia:** Principalmente a mis papás, por su apoyo incondicional, por la confianza que han depositado en mí, por sus enseñanzas y regaños, por los valores que me han enseñado a lo largo de mi vida; a mis hermanos, gracias por su cariño, enojos y peleas; a mis abuelas Mama Cata y Mama Berta, por su amor y sus atenciones desde mi infancia; a mis tíos Karin, Luisa, William, Katty, José, Quique, Tita y Mencha, por su cariño y apoyo; a mis primos, por sus palabras de apoyo.

**A mi novio:** Por su amistad y cariño incondicional, por tantas tareas compartidas culpables de muchos desvelos y enojos, por esas charlas y debates que nos hacen reír y enojarnos a la vez, por todos los conocimientos compartidos y principalmente por su compañía.

**A mis amigos:** Luis Meyer, Edwin Porón, Sara Montiel, Selvin Tunche, personas especiales que conocí en la ENCA, son como hermanos para mí; a mis amigos que juntos iniciamos una nueva etapa en la Facultad de Agronomía, siempre será un placer compartir con ustedes; a Sari Galindo, Lilian Saravia, gracias por su amistad incondicional y sus conocimientos compartidos durante mi estancia en BIOMAG, a mis amigas de la Facultad de Agronomía, Mafer Mayorga y Elida Chutá, gracias por esas horas de almuerzo y tiempos libres

compartidos; y a todas esas personas que me han brindado su amistad durante las giras y laboratorios impartidos y por hacer de mi trabajo algo especial e interesante, se les aprecia.

**A mis profesores:** De la ENCA y la de Facultad de Agronomía, por sus conocimientos compartidos a lo largo de mi formación profesional.

**A BIOMAG:** A Luis Guevara, por brindarme la oportunidad de realizar mi EPS en la Biofábrica y por su confianza depositada en mí.

**A mi supervisor:** A Fernando Rodríguez Bracamonte, por su paciencia y atención durante mi EPS y la realización de mi trabajo de graduación.

**A mi asesor:** Julio Berdúo, por su amistad y conocimientos compartidos durante la realización de mi investigación.

**A la subárea de MMP:** A Paquito Vásquez, Eduardo Pretzanzin, Fernando Rodríguez Bracamonte, Julio Berdúo, Edgar Franco y Rafael Rodríguez, que en su momento fueron mis profesores y compañeros de trabajo, gracias por su amistad y por brindarme la oportunidad de laborar en la subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas, gracias por todo su apoyo.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
<b>CAPITULO I. DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL INGENIO MAGDALENA, SAN PATRICIO, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.</b> .....	<b>1</b>
1.1    PRESENTACIÓN.....	2
1.2    MARCO CONCEPTUAL .....	3
1.2.1    Consideraciones básicas para el establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales .....	3
1.3    MARCO REFERENCIAL.....	8
1.3.1    Ubicación geográfica .....	9
1.3.2    Características edafológicas .....	11
1.3.3    Condiciones climáticas .....	11
1.3.4    Zonas de vida .....	11
1.4    OBJETIVOS.....	12
1.4.1    General .....	12
1.4.2    Específicos.....	12
1.5    METODOLOGÍA .....	12
1.5.1    Recolección de la información .....	12
1.5.2    Análisis de la información .....	13
1.6    RESULTADOS.....	14
1.6.1    Propósitos del laboratorio .....	14
1.6.2    Estructura organizacional .....	14
1.6.3    Organización del laboratorio .....	15
1.6.4    Cultivos manejados.....	20
1.6.5    Principales medios de cultivo.....	20
1.6.6    Manejo de contaminación .....	21
1.6.7    Análisis FODA.....	22
1.7    CONCLUSIONES .....	26
1.8    BIBLIOGRAFÍA .....	26

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>CAPITULO II. EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE ANTURIO (<i>ANTHURIUM ANDREANUM</i>) EN LA FINCA SAN PATRICIO, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C. A. ....</b>	<b>29</b>
2.1 PRESENTACIÓN.....	30
2.2 MARCO CONCEPTUAL .....	31
2.2.1 Establecimiento de cultivos vegetales .....	31
2.2.2 Morfogénesis .....	38
2.2.3 Generalidades del cultivo de Anturio ( <i>Anthurium sp.</i> ).....	41
2.3 MARCO REFERENCIAL.....	43
2.3.1 Cultivo <i>in Vitro</i> de <i>Anthurium andreanum</i> .....	43
2.3.2 Ensayos realizados para la propagación <i>in Vitro</i> de Anturio.....	46
2.3.3 Aspectos considerados para la evaluación de callos.....	47
2.3.4 Lugar y condiciones del lugar .....	47
2.4 OBJETIVOS.....	48
2.4.1 General.....	48
2.4.2 Específicos.....	48
2.5 HIPÓTESIS.....	48
2.6 MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
2.6.1 Materiales y equipo.....	49
2.6.2 Metodología .....	49
2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
2.7.1 Fase I: Inducción de callos .....	57
2.7.2 Fase II: formación de brotes .....	64
2.8 CONCLUSIONES .....	69
2.9 RECOMENDACIONES.....	70
2.10 BIBLIOGRAFIA.....	70
2.11 ANEXOS.....	73
<b>CAPITULO III. SERVICIOS REALIZADOS EN LA BIOFÁBRICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INGENIO MAGDALENA, S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA. ....</b>	<b>75</b>

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
3.1 PRESENTACIÓN.....	76
3.2 MARCO CONCEPTUAL .....	77
3.2.1 Generalidades del cultivo de caña de azúcar ( <i>Saccharum spp.</i> ).....	77
3.2.2 El Calcio en las plantas.....	80
3.2.3 Multiplicación <i>in vitro</i> de meristemos de caña de azúcar .....	83
3.3 MARCO REFERENCIAL.....	85
3.3.1 Lugar y condiciones del lugar .....	85
3.4 EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CONCENTRACIONES DE CALCIO EN LA EMISIÓN DE RAÍCES PARA CAÑA DE AZÚCAR ( <i>SACCHARUM SPP.</i> ).....	86
3.4.1 Objetivos.....	86
3.4.2 Metodología .....	86
3.4.3 Resultados y discusión .....	89
3.4.4 Conclusiones .....	104
3.5 EFECTO DE TRES MÉTODOS DE DESINFECCIÓN EN YEMAS DE CAÑA DE AZÚCAR ( <i>SACCHARUM SPP.</i> ) PARA LA EXTRACCIÓN DE MERISTEMOS.....	105
3.5.1 Objetivos.....	105
3.5.2 Metodología .....	105
3.5.3 Resultados y Discusión.....	110
3.5.4 Conclusiones .....	114
3.6 BIBLIOGRAFÍA .....	114



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Áreas de un laboratorio de cultivo de tejidos. (Roca & Mroginski, 1993).....	3
2. Cámara de flujo laminar y sus partes (Pierik, 1993). .....	6
3. Vista aérea de la biofábrica e invernaderos del departamento de Biotecnología. (Fuente: Ingenio Magdalena S.A.).....	9
4. Ubicación geográfica finca San Patricio (Fuente: Ingenio Magdalena S.A.).....	10
5. Estructura organizacional del departamento de Biotecnología. ....	15
6. Croquis de las instalaciones de la Biofábrica del Ingenio Magdalena. ....	17
7. Proporciones de plantas que se producen dentro de la Biofábrica.....	20
8. Rutas de movilización de las personas dentro del laboratorio. ....	22
9. Diagrama de regeneración indirecta en <i>Anthurium</i> (Te-Chato et al., 2006; Chen, 1997; Adelheid et al., 1992).....	45
10. Hojas jóvenes seleccionadas para la propagación <i>in Vitro</i> de Anturio.....	53
11. Parámetro estimado para el conteo de brotes. ....	55
12. (1) Brotes no mayores a 1 cm, (2) brotes mayores a 1 cm y menores de 2 cm, (3) brotes mayores a 2 cm. ....	56
13. Metodología utilizada para la propagación <i>in Vitro</i> de Anturio. ....	56
14. Explantes con proliferación de callos en bordes (izquierda); callos con abundante formación de masa de células (derecha). ....	57
15. Porcentaje de formación de callos en segmentos de hojas de <i>Anthurium andreaum</i> para cada uno de los medios de cultivo utilizados. ....	58
16. Porcentaje de contaminación acumulada obtenida durante la fase I.....	59
17. Grado de desarrollo de los callos formados según escala de Santana: (1) ligera formación de callo, grado 1; (2) formación de callo, grado 2; (3) abundante formación de callo, grado 3. ....	60
18. Porcentaje de desarrollo de callos según escala de Santana. ....	62
19. Callos friables (1), callos compactos (2). ....	64
20. Formación de brotes para cada medio de cultivo evaluado.....	65
21. Brotes obtenidos en la fase II en cada medio de cultivo evaluado. ....	66
22. Número promedio de brotes por callo para cada medio de cultivo. ....	67

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
23. Clasificación de tamaño de brotes para cada uno de los medios de cultivo evaluados.....	68
24. Movimiento del Calcio en el retículo endoplasmático (Hepler et al., 1981).....	81
25. Brotación de yemas para la obtención de meristemos (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012). .....	84
26. Detalle del meristemo apical utilizado como explante (Aumento 15X) (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012).....	85
27. División y siembra de brotes de caña. ....	88
28. Formación de raíces adventicias en caña de azúcar.....	90
29. Porcentaje de inducción de raíces en brotes de caña de azúcar para cada uno de los tratamientos evaluados. ....	92
30. Unidades experimentales contaminadas por presencia de hongo y bacterias. ....	94
31. Porcentaje de unidades experimentales contaminadas para cada tratamiento evaluado. ....	94
32. Número promedio de raíces adventicias obtenidas para cada tratamiento evaluado. ....	97
33. Raíces adventicias obtenidas en brotes de caña de azúcar. Agua con 20 ppm de Calcio (1); MS con 20 ppm de Calcio (2); MR con 60 ppm de Calcio (3). ....	98
34. Representación del largo de raíces adventicias. ....	98
35. Comparación del número y largo promedio de raíces obtenidas.....	99
36. Número promedio de brotes inducidos.....	100
37. Nuevos brotes obtenidos en caña de azúcar.....	100
38. Comparación del número y tamaño de brotes obtenidos. ....	101
39. Brotes obtenidos en agua con 0 ppm de Calcio. ....	101
40. Brotes obtenidos en medio MS con 20 ppm de Calcio. ....	102
41. Brotes obtenido en el medio MR con 100 ppm de Calcio. ....	103
42. Brotes meristemáticos de caña de azúcar (toletes). ....	108
43. Toletes después de la eliminación de folíolos externos. ....	108
44. Toletes desinfectados, listos para la extracción de meristemos. ....	109

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
45. Extracción de meristemos en caña de azúcar. ....	109
46. Porcentaje de contaminación, mortalidad y meristemos libres para cada uno de los métodos evaluados. ....	112
47. Número de meristemos contaminados-muertos vs. meristemos libres de contaminación.....	113



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Análisis FODA sobre el laboratorio de propagación de plantas.....	23
2. Matriz FODA de forma analítica.....	25
3. Composición de tres medios básicos usados en el cultivo <i>in Vitro</i> de tejidos.....	34
4. Origen de los explantes y respuestas obtenidas en el cultivo <i>in Vitro</i> de <i>Anthurium andreanum</i> (Mejía, 2007) .....	44
5. Explantes utilizados para la regeneración directa e indirecta de plántulas de <i>Anthurium sp.</i> (Mejía, 2007).....	45
6. Combinaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de callos.....	50
7. Medios de cultivo evaluados en la fase de inducción de callos. ....	51
8. Combinaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de brotes. ....	52
9. Medios de cultivo evaluados en la fase de regeneración de brotes.....	52
10. Callos existentes y tamaño de muestra obtenida por tratamiento. ....	55
11. Clasificación de callos según escala de Santana. ....	61
12. A. Medio MS modificado con los macroelementos reducidos al 50%.....	73
13. A. Medio MS modificado con 200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> .....	74
14. Descripción de tratamientos para la inducción de raíces en plantas de caña de azúcar. ....	87
15. Datos obtenidos para las variables respuestas en cada tratamiento evaluado (R=número de repeticiones) .....	91
16. Unidades experimentales contaminadas y tipo de contaminación.....	93
17. Datos promedio para las variables respuestas en cada uno de los tratamientos evaluados. ....	96
18. Resultados obtenidos para cada medio de cultivo con 0 ppm de Calcio. ....	104
19. Método tradicional para la desinfección y limpieza de toletes de caña en el área de recepción de material vegetal. ....	106
20. Método tradicional para la desinfección de toletes en el área de multiplicación. ....	106
21. Método 2 para la desinfección y limpieza de toletes de caña en el área de recepción de material vegetal. ....	107

22. Método 2 para la desinfección de toletes en el área de multiplicación. ....	107
23. Método 3 para la desinfección y limpieza de toletes de caña en el área de recepción de material vegetal. ....	107
24. Método 2 para la desinfección de toletes en el área de multiplicación. ....	108
25. Número y porcentaje de meristemos contaminados por bacterias. ....	111
26. Número y porcentaje de meristemos contaminados por hongos. ....	111
27. Número y porcentaje de mortalidad de meristemos. ....	111
28. Número y porcentaje de meristemos libres de contaminación. ....	112

## RESUMEN

El estudio y la aplicación de nuevas técnicas para la propagación de las especies vegetales, hoy en día poseen mucha importancia, debido a que mejoran de manera eficiente la propagación y la obtención de nuevas plantas con características deseables; es aquí donde la biotecnología vegetal juega un papel importante e innovador para aquellas empresas que se dedican a la producción masiva de especies vegetales; debido a que el uso de cultivo de tejidos vegetales *in Vitro*, viene a ser una técnica muy atractiva para la producción masiva de plantas; el cual consiste en el aislamiento de un explante, que es cultivado en un medio de composición química definida e incubado bajo condiciones controladas. El Ingenio Magdalena, dentro del departamento de biotecnología, posee un laboratorio de meristemas, el cual es llamado “Biofábrica”, dentro de la cual se lleva a cabo toda una cadena de producción de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), orquídeas y algunas especies ornamentales a través del uso de la técnica de micropropagación.

Uno de los principales propósitos de la biofábrica es la producción de plántulas de caña de azúcar a través de la obtención de meristemas y la propagación sexual *in vitro* de orquídeas, dentro de las cuales pueden mencionarse algunos géneros como: *Catleya*, *Phaleanopsis*, *Cimbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium* y *Lycaste*; para conocer la situación actual del laboratorio, se realizó un diagnóstico para la elaboración de un análisis FODA y su posterior análisis a través de una matriz comparativa. Así mismo se reportaron tres investigaciones realizadas durante el ejercicio profesional supervisado comprendido del periodo febrero a noviembre del año 2012; dos de ellas realizadas en caña de azúcar y una realizada en Anturio (*Anthurium andreanum*).

Se evaluaron medios de cultivo para la propagación *in Vitro* de Anturio (*Anthurium andreanum*). La investigación se dividió en dos fases, en la primera fase se estudió la inducción de callos a partir de explantes de hoja, evaluándose dos modificaciones del medio basal MS, y diferentes concentraciones de 2,4-D (0.1 mg/l y 0.5 mg/l), BAP (0.5 mg/l y 1 mg/l) y Kinetina (0.5 mg/l y 1 mg/l); y en la segunda fase se estudió la regeneración de brotes en callos, se utilizó el medio basal MS, un tratamiento con 1 mg/l

de BAP y tres tratamientos con 0.05 mg/l de IBA combinado con diferentes dosis de BAP (0.6, 1 y 3 mg/l). Los resultados se analizaron descriptivamente y fueron comparados en base al porcentajes de inducción de brotes; para la variedad estudiada, el mayor porcentaje de inducción de callos se obtuvo utilizando el medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$  combinado con 0.1 mg/l de 2,4-D más 0.5 mg/l de BAP. Alcanzando un desarrollo grado tres (3) según la escala de Santana (1982) con el medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$  combinado con 0.1 mg/l de 2,4-D más 1 mg/l de BAP. Con el medio MS, 0.05 mg/l de IBA y 3 mg/l de BAP en el 100% de los callos se estimuló la producción de brotes, verdes, robustos y bien desarrollados.

Dentro de los servicios realizados se reportaron dos investigaciones en caña de azúcar, una de ellas estuvo enfocada en la reducción de contaminación en meristemas para el establecimiento de la propagación in vitro, determinado que actualmente no se cuenta con una metodología adecuada para la obtención de meristemas libres de contaminación y es posible mejorar los resultados debido a que el laboratorio cuenta con unidades térmicas internas para la desinfección de yemas por termoterapia.

En la segunda investigación se determinó que el medio de cultivo MR, el cual es utilizado actualmente para la etapa de enraizamiento de brotes de caña de azúcar, puede ser sustituido por el medio MS adicionando 20 ppm de Calcio, debido a que se determinó que este nutriente puede actuar como un regulador de crecimiento, ayudando a la inducción y formación de raíces y brotes.

**CAPITULO I. DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL  
INGENIO MAGDALENA, SAN PATRICIO, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA,  
GUATEMALA, C.A.**

## 1.1 PRESENTACIÓN

El Ingenio Magdalena S.A. es una empresa agroindustrial que se dedica principalmente a la producción e industrialización de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*); sin embargo como empresa reconoce a la investigación como un proceso importante en la generación de conocimiento, desarrollo y adopción de tecnología como factores tendiente a la eficiencia.

Actualmente el Ingenio Magdalena se encuentra dentro de las principales empresas productoras de azúcar y sus derivados, además de ser uno de los distribuidores principales de plántulas de caña; ya que dentro del departamento de biotecnología el ingenio cuenta con una Biofábrica que se dedica a la producción de plantas in vitro, de las cuales el 80% es de caña de azúcar.

Con el propósito de conocer y describir las actividades que se llevan a cabo dentro de la Biofábrica, se realizó el presente diagnóstico. Obteniendo información realizando entrevistas al personal administrativo, como a los operadores que laboran dentro del laboratorio; con la información obtenida se realizó un análisis FODA que benefició como base para la propuesta de toma de decisiones futuras.

Se identificó que el cultivo con mayor importancia dentro del laboratorio es la caña de azúcar, debido a que representa un 80% de la producción total, sin embargo existen otros cultivos de importancia ornamental; una de las principales debilidades encontradas dentro del laboratorio es la falta de una certificación que garantice las buenas prácticas en la empresa para alcanzar la producción masiva y comercialización de vitroplantas (ISO 9001), sin embargo se propone la búsqueda de dicha certificación para poseer un aval de la calidad de las plantas obtenidas.

## 1.2 MARCO CONCEPTUAL

### 1.2.1 Consideraciones básicas para el establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales

En la planeación y organización de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales deben tomarse en cuenta, principalmente, las condiciones de asepsia en las que se trabaja, así como su funcionalidad, por lo cual se puede dividir en áreas según las funciones que se desarrollen (Figura 1). Un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales no es muy distinto de cualquier otro laboratorio de investigación; la diferencia principal estriba en las condiciones de asepsia que se requieren (Tejidos, 2009).

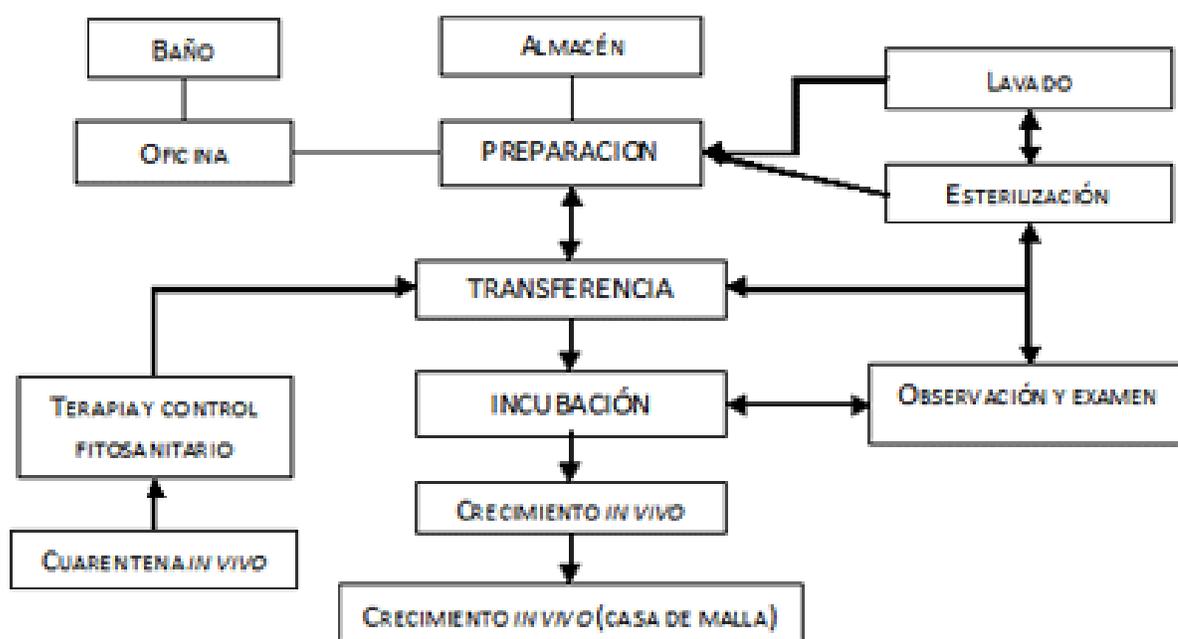


Figura 1. Áreas de un laboratorio de cultivo de tejidos. (Roca & Mroginski, 1993).

Aunque los principios son básicamente invariables en todos los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, su aplicación puede presentar variaciones en magnitud y complejidad, dependiendo de los objetivos del laboratorio; así, mientras que un laboratorio de investigación puede ser pequeño en tamaño pero muy especializado en equipos e instalaciones, uno de producción comercial tiende a ser grande y simple. Un laboratorio de investigación puede también tener un rol de enseñanza y, en este caso, es frecuente que

se asignen en él áreas especiales para la enseñanza y la demostración (Roca & Mroginski, 1993).

El laboratorio de cultivo de tejidos debe disponer de un área destinada al establecimiento, crecimiento y multiplicación de las plantas producidas; esta área es especialmente necesaria en los laboratorios de investigación y desarrollo y en los de producción comercial. Aquellos laboratorios que se dedican a la producción y distribución de materiales de sanidad certificada, por ejemplo, deben incluir además facilidades para la cuarentena y para la evaluación fitosanitaria (Roca & Mroginski, 1993).

Existen recomendaciones para la planificación de ciertos tipos de laboratorio; como ejemplos se pueden mencionar, la propagación masiva de fresas (Boxus et al., 1984), la producción de semilla básica de papa (Van Uyen et al., 1983), con los estudios de fijación de Nitrógeno *in vitro* (Rupela et al., 1984), y con otros aspectos relacionado con el establecimiento del laboratorio (Bonga, 1982).

#### **1.2.1.1 Organización del laboratorio**

Un laboratorio de cultivo de tejidos se puede dividir esquemáticamente en áreas separadas para las diferentes funciones que se desarrollan en él (Figura 1); en la práctica, sin embargo, algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente (Roca & Mroginski, 1993). Las áreas o secciones principales son:

##### **A. Área de preparación**

Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo que serán utilizados en las diferentes fases de desarrollo, debe proveer también un espacio para almacenar el material de vidrio o plástico, además de los reactivos químicos. Debe contar con equipos como: balanzas analíticas y semianalíticas, cronómetro, potenciómetro (medición de pH), refrigerador, congelador, destilador de agua e instalación de gas. También puede contar con incubadora o cámara de crecimiento (Tejidos, 2009).

## **B. Área de lavado y esterilización**

Puede estar constituida por dos áreas conectadas entre sí, o por un solo ambiente, localizado dentro del área general de preparación (Roca & Mroginski, 1993).

En la sala de lavado se lleva a cabo la limpieza de la cristalería y material de plástico, que puede incluir además de una lavadora de cristalería, una estufa u horno para el secado de la misma, o en su defecto un fregadero amplio. Debe tener agua caliente y fría, y es aconsejable que posea agua de muy buena calidad, puede ser de desionizador y/o destilador. En esta sala se puede instalar el autoclave para esterilización y también puede contar con un lavadero destinado solamente para el material contaminado, el cual se lleva a la zona de lavado una vez ha sido pasado por el autoclave de material contaminado (Tejidos, 2009).

El área de esterilización debe tener espacio para el autoclave vertical u horizontal, el cual puede ser pequeño (olla de presión) o grande (de carga frontal y de enfriamiento lento y rápido), según sea el volumen del material que se procese (Roca & Mroginski, 1993).

## **C. Área de transferencia**

En esta se realiza el trabajo de excisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo. (Roca & Mroginski, 1993); se deben tener los máximos cuidados de asepsia, para lo cual se emplean cámaras de flujo laminar de aire (Figura 2), utensilios estériles, cubrebocas (mascarillas), cubrecabezas y aire filtrado en la sala; estereoscópico, lupa con lámpara, instrumentos de disección, lámpara de luz ultravioleta. Las cámaras de flujo laminar deben ubicarse en un lugar alejado de las puertas, con un mínimo de corriente de aire, para prolongar la vida útil de los filtros (Tejidos, 2009).

## **D. Área de incubación**

Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado, en gabinetes o cámaras de crecimiento; éstas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental, pero son más costosas. El área de incubación o crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la

temperatura (20 a 28°C), de la iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa (70 a 80%) (Roca & Mroginski, 1993).

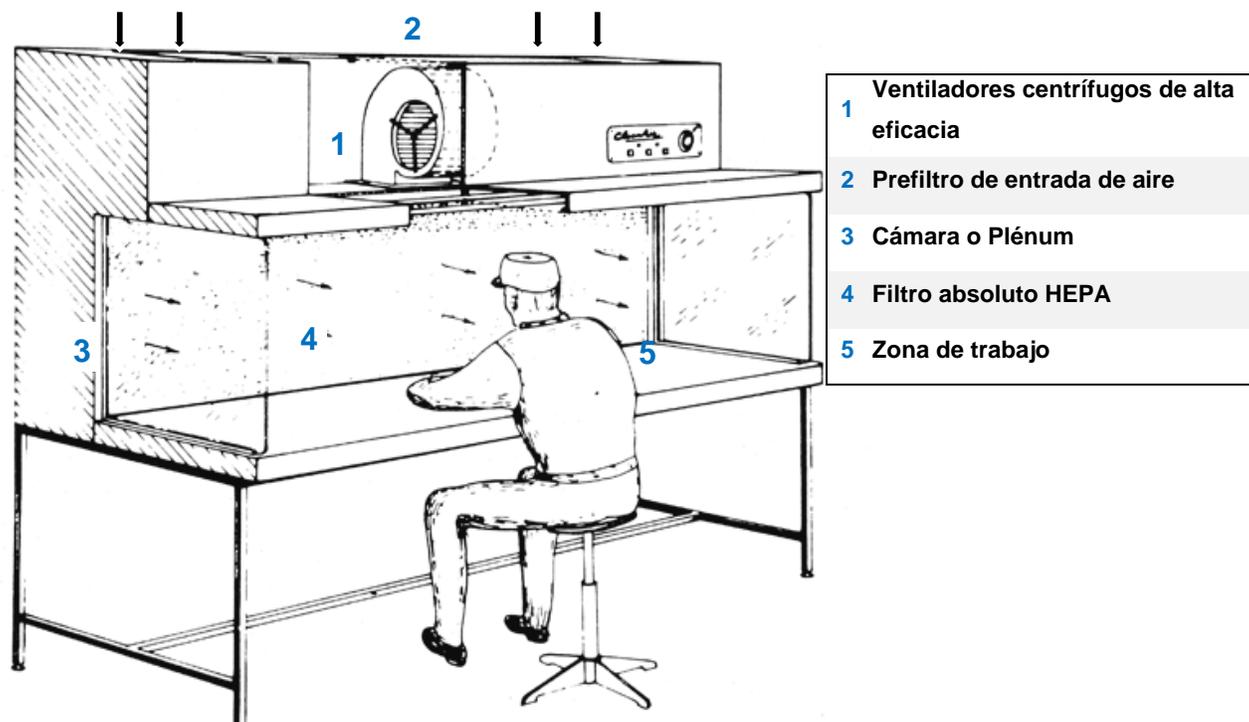


Figura 2. Cámara de flujo laminar y sus partes (Pierik, 1993).

En el cuarto de incubación se instalan estanterías metálicas o de madera para colocar los cultivos; pueden tener dimensiones variables: el ancho entre 0.3 m y 1.00 m el largo de acuerdo al tamaño del cuarto, la altura total de 1.80 a 2.20 m; la distancia entre entrepaños es de 0.2 a 0.5 m. El área debe incluir, además, un espacio para cultivos en agitación y para cultivos estáticos en oscuridad (Roca & Mroginski, 1993).

Debido al calor generado, pueden necesitarse algunos ventiladores en el cuarto o sala. Las áreas de siembra e incubación idealmente son las más alejadas de la entrada y del flujo de personas para tratar de evitar contaminaciones (Tejidos, 2009).

### **E. Área de observación y examen**

Generalmente los microscopios (estéreo, compuesto, invertido y otros) se localizan tanto en el área de incubación como en la de transferencia, pero opcionalmente pueden estar en un área separada. El objetivo de esta área es realizar observaciones periódicas de los cultivos, tanto en medios semisólidos como en líquidos (Roca & Mroginski, 1993).

Las áreas descritas anteriormente se pueden considerar como el núcleo del laboratorio de cultivo de tejidos. Los laboratorios de investigación y desarrollo y los de producción comercial deben contar, además, con las siguientes instalaciones (Roca & Mroginski, 1993):

### **F. Área de crecimiento**

Las plantas que se regeneran en el área de incubación se pueden acondicionar o aclimatar y luego trasplantar en macetas, bandejas o camas apropiadas. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en tinglados, casas de malla o invernaderos, dependiendo de las condiciones climáticas del lugar donde está ubicado el laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias (Roca & Mroginski, 1993).

Después del trasplante, las plantas generalmente necesitan un acondicionamiento gradual a las condiciones de campo, lo cual se puede lograr usando nebulización, cámaras húmedas de plástico, etc. (Roca & Mroginski, 1993).

### **G. Áreas de cuarentena y de control fitosanitario**

Cuando la función del laboratorio es la producción de materiales élites de sanidad certificada, se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras o plantas destinadas a la limpieza, generalmente protegida contra insectos; debe estar separada del resto del laboratorio pero cercana al área de control fitosanitario (Roca & Mroginski, 1993).

En el área de control sanitario se realizan las pruebas necesarias para comprobar la sanidad del material vegetal, especialmente de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos. La mayor o menor complejidad del equipo usado para realizar estas pruebas depende del conocimiento de la patología de la especie y del grado de garantía fitosanitaria que se demanda o se desea ofrecer con el material vegetal (Roca & Mroginski, 1993).

#### **H. Área de oficina**

En ésta se deben ubicar en el mobiliario de oficina como escritorios, archivos y almacenamiento de datos, los libros de referencia y de control del laboratorio, los catálogos y otros documentos. También se coloca en ella el equipo de cálculo o computación (Roca & Mroginski, 1993).

La seguridad física del personal del laboratorio es importante; por esta razón se deben tomar precauciones para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores de incendios y frazadas contra fuego, así como duchas para baños del cuerpo entero y de los ojos. Lo más indicado es prevenir los accidentes con medidas de seguridad como el uso de compartimientos especiales para almacenar reactivos peligrosos (solventes orgánicos, ácidos, alcohol, Nitrógeno líquido) ubicados en el área general de preparación y en otras áreas del laboratorio; la capacitación del personal en las técnicas de manipulación y uso apropiado del equipo, material de vidrio, reactivos y otros elementos es la mejor forma de prevenir accidentes en el laboratorio (Roca & Mroginski, 1993).

### **1.3 MARCO REFERENCIAL**

El Laboratorio de propagación *in vitro*, generalmente conocido como laboratorio de Meristemas, forma parte del departamento de Biotecnología "BIOMAG" del área de Investigación y Desarrollo Agrícola del Ingenio Magdalena.

El departamento de Biotecnología cuenta con diferentes áreas productivas, dentro de las cuales es posible mencionar el programa de producción de entomopatógenos utilizados

para el control biológico de plagas específicas que afectan la caña de azúcar, la producción *in vitro* y aclimatación de plántulas de caña de azúcar, orquídeas y especies ornamentales.

En el 2008, el laboratorio de Meristemas aumenta su capacidad de producción convirtiéndose en una Biofábrica (Figura 3) con una capacidad instalada de producción artificial de plantas, a través de la técnica de multiplicación de tejidos vegetativos o micropropagación de 2, 500,000 plántulas por año. El 80% de su producción es la caña de azúcar y el 20% a otros vegetales (Historia, 2013).



Figura 3. Vista aérea de la biofábrica e invernaderos del departamento de Biotecnología. (Fuente: Ingenio Magdalena S.A.)

### 1.3.1 Ubicación geográfica

La finca San Patricio del Ingenio Magdalena se encuentra ubicada en el municipio de La Democracia Escuintla (Figura 4), dentro de las coordenadas geográficas: Latitud 14°7'40.51" Norte y Longitud 90°57'51.41" Oeste, a una altitud de 57 metros sobre el nivel del mar.



Figura 4. Ubicación geográfica finca San Patricio (Fuente: Ingenio Magdalena S.A.)

### **1.3.1.1 Colindancias**

La finca San Patricio colinda al Norte con la Finca Santa Cristina; al Sur con Santa Rita y Las Ilusiones; al Este con la Finca Bugarvilla y al Oeste con la finca La Flor (Flores Tecún, 2012).

### **1.3.2 Características edafológicas**

Según el mapa de suelos del Ingenio Magdalena, los suelos de la finca San Patricio son suelos Entisoles, descritos como no evolucionados, muy permeables y de textura gruesa. (Flores Tecún, 2012).

### **1.3.3 Condiciones climáticas**

Según el Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología (INSIVUMEH), las características climáticas de la región contemplan una temperatura media anual entre 25 a 28 grados centígrados, con una precipitación promedio de 2500 a 3000 mm/año. Siendo los meses con mayor precipitación de Mayo a Octubre, y los meses con menor precipitación de Noviembre a Abril.

### **1.3.4 Zonas de vida**

Según el sistema de clasificación de zonas de vida de Guatemala, realizado por de la Cruz (1982), la finca San Patricio se encuentra ubicada en la zona de vida Bosque Húmedo Subtropical cálido (bmh-S (c)), que se caracteriza por mantener una precipitación anual promedio de 1696 milímetros, con una temperatura promedio entre 15 y 38 °C.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 General**

Conocer la situación actual del laboratorio de meristemas “Biofábrica” del departamento de Biotecnología del Ingenio Magdalena.

### **1.4.2 Específicos**

- a. Identificar las especies o cultivos que se manejan actualmente y la importancia de cada uno de ellos.
- b. Describir el control preventivo de contaminación utilizado dentro de la Biofábrica.
- c. Realizar un análisis FODA y una matriz de forma analítica para conocer la situación actual del laboratorio y su entorno.

## **1.5 METODOLOGÍA**

### **1.5.1 Recolección de la información**

#### **1.5.1.1 Definición del estudio**

El diagnóstico se realizó en la Biofábrica del Ingenio Magdalena S.A. ubicado en la finca San Patricio, La Democracia, Escuintla.

#### **1.5.1.2 Tiempo y espacio**

Fue realizado durante 10 meses, comprendido de febrero a noviembre de 2012; la información obtenida se analizó y documentó en el departamento de Biotecnología del Ingenio Magdalena.

#### **1.5.1.3 Observación y entrevistas**

El uso de la técnica de observación y la realización de entrevistas sirvieron para conocer la infraestructura y las actividades realizadas dentro del laboratorio, además de identificar los cultivos que se manejan. El personal que labora en el área ayudó a la identificación de las

condiciones del establecimiento de los cultivos y la importancia de la producción de cada uno.

Para conocer los requisitos de prevención y contrarresto de la contaminación, se consultaron las normas internas del laboratorio, las cuales dan a conocer las restricciones de ingreso. Conjuntamente se identificaron las acciones que se llevan a cabo para determinar el grado de contaminación de las diferentes áreas, las acciones que se efectúan para reducir dicha contaminación (en caso de que existiera); además de identificar la problemática existente dentro del laboratorio y la determinación de las causas y efectos.

Posteriormente se procedió a identificar las líneas de investigación, tratando de conocer las necesidades que se tienen actualmente para el enriquecimiento de información y posterior implementación de investigaciones.

### **1.5.2 Análisis de la información**

Se realizó un análisis de la información obtenida en fuentes secundarias (revisión bibliográfica) sobre las consideraciones básicas para el establecimiento y el manejo de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales; analizando aspectos en cuanto a la organización y distribución de áreas y actividades dentro del laboratorio.

#### **1.5.2.1 Realización de un análisis FODA**

Se realizó un análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas) de la información obtenida durante el diagnóstico.

Este análisis fue realizado en cuatro pasos:

- Análisis Externo
- Análisis Interno
- Confección de la matriz FODA
- Determinación de la estrategia a emplear

## 1.6 RESULTADOS

### 1.6.1 Propósitos del laboratorio

- Producción de plántulas de caña de azúcar a través de la obtención de meristemas.
- Propagación sexual *in vitro* de orquídeas, dentro de las cuales pueden mencionarse algunos géneros como: *Catleya*, *Phaleanopsis*, *Cimbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium* y *Lycaste*.
- Micropropagación y producción de diferentes especies ornamentales con el fin de enriquecer el área ornamental de BIOMAG.
- Asegurar la calidad de plantas obtenidas a través de la propagación *in vitro*.
- Obtener plantas libres de virus, plagas y enfermedades.
- Incrementar la tasa de multiplicación de los cultivos manejados.

### 1.6.2 Estructura organizacional

La Biofábrica forma parte del departamento de Biotecnología del área de investigación y desarrollo agrícola del Ingenio Magdalena, área que se encuentra dentro de la gerencia de recursos humanos, la cual tiene destinado a un gerente que transmite la autoridad y responsabilidad correlativa, estableciendo una relación de subordinado entre el jefe del departamento de Biotecnología “BIOMAG”, el encargado de la Biofábrica, seguido por los técnicos y operadores del área de multiplicación *in vitro* y de elaboración y distribución de medios de cultivo.

En la Figura 5 se muestran la estructura organizacional en diferentes jerarquías del departamento de Biotecnología “BIOMAG”, enfocado directamente al laboratorio de meristemas “Biofábrica”.

Las actividades que cada jerarquía tiene a su cargo son:

- **Jefe del departamento de biotecnología:** se encarga de la planificación, programación y supervisión de las actividades realizadas dentro de las diferentes áreas productivas del departamento de Biotecnología.

- **Encargado de Biofábrica:** se encarga de la supervisión general de las actividades realizadas dentro del laboratorio y principalmente de la toma de decisiones para el logro de los objetivos y metas planteadas para la producción de plantas. Los objetivos y metas son formulados junto con el jefe del departamento de Biotecnología.
- **Técnico de multiplicación:** este técnico tiene a su cargo el área de multiplicación *in vitro*, área en donde se realiza la siembra y división de material vegetal, dándole las condiciones de asepsia y ambientales necesarias para el buen crecimiento.
- **Técnico de elaboración de medios de cultivo:** este técnico tiene a su cargo el área de preparación y distribución de medios de cultivo, área de esterilización y área de lavado; las actividades principalmente se enfocan a mantener la calidad de los medios de cultivo utilizados dentro del área de multiplicación *in vitro*.

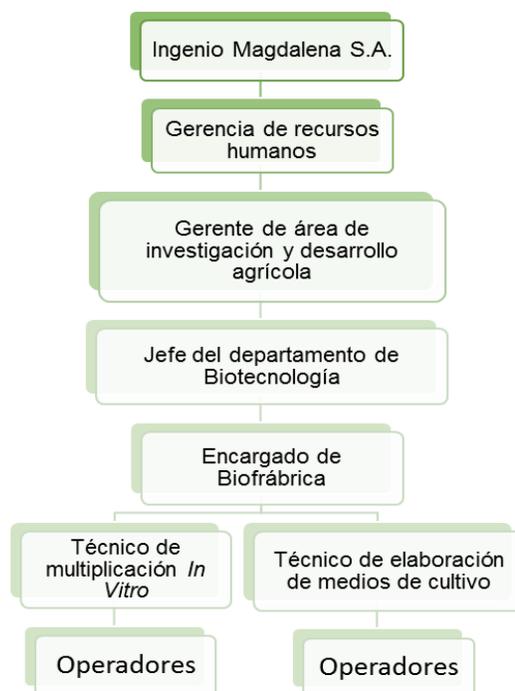


Figura 5. Estructura organizacional del departamento de Biotecnología.

### 1.6.3 Organización del laboratorio

El Laboratorio de propagación cuenta con áreas separadas para las diferentes funciones que dentro de él se desarrollan, cabe mencionar que algunas de las funciones pueden

desarrollarse en un mismo ambiente. Las áreas principales con las que cuenta el laboratorio:

- Preparación y distribución de medios de cultivo
- Esterilización de medios de cultivo y cristalería
- Multiplicación de plantas
- Lavado de cristalería
- Entrada y salida de material vegetal
- Desarrollo de plantas
- Almacenamiento de cristalería

Además el laboratorio cuenta con las instalaciones:

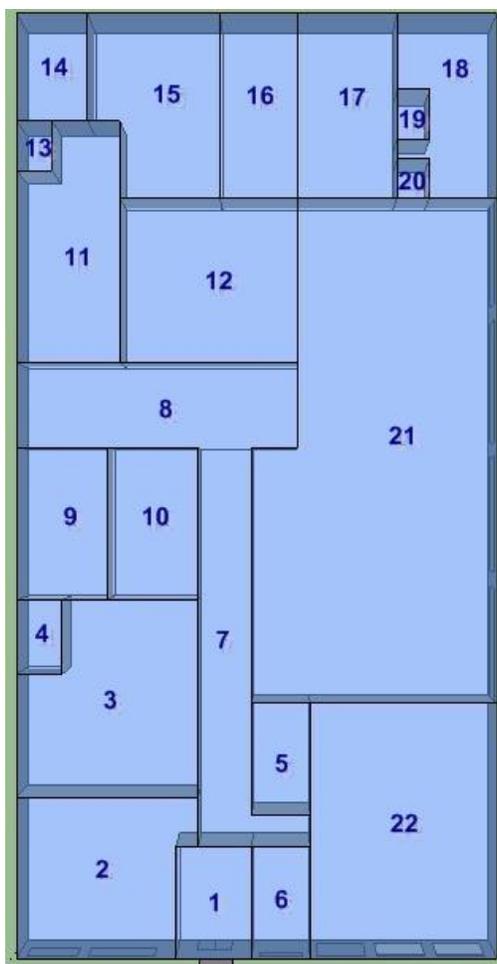
- Recepción de personal
- Comedor
- Sala de reuniones
- Oficinas
- Dos pasillos
- Tres baños (dos de ellos con sus respectivas duchas)

Según lo mencionado, la Figura 6 presenta la distribución de áreas dentro del laboratorio.

### **1.6.3.1 Descripción de labores**

#### **a. Área de preparación y distribución de medios de cultivo**

Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, que posee repisas aéreas para el almacenamiento de cristalería y reactivos químicos en uso. Cuenta con mesas de trabajo para la preparación de los medios, balanzas analíticas y semianalíticas para el pesado de reactivos, una plancha eléctrica con agitador magnético, un potenciómetro, un sistema de destilación del agua, una máquina de distribución de medios y un refrigerador para el almacenamiento de soluciones stock.



1	Recepción	12	Área de multiplicación
2	Comedor	13	Baño interno
3	Sala de reuniones	14	Bodega interna
4	Baño de oficina	15	Área de preparación y distribución de medios de cultivo
5	Baño de hombres	16	Área de Lavado
6	Baño de mujeres	17	Área de entrada y salida de material vegetal
7	Pasillo principal	18	Bodega externa
8	Pasillo secundario	19	Unidad térmica 1
9	Oficina principal	20	Unidad térmica 2
10	Oficina de encargado	21	Área de desarrollo de plantas 1
11	Área de esterilización	22	Área de desarrollo de plantas 2

Figura 6. Croquis de las instalaciones de la Biofábrica del Ingenio Magdalena.

### a. Área de esterilización

Se utiliza para la esterilización de medios de cultivo, cristalería y utensilios utilizados en la transferencia de plantas dentro del área de multiplicación. Esta área posee un autoclave

vertical y 6 estantes para el almacenamiento del medio de cultivo. La cristalería y utensilios esterilizados son almacenados en el área de almacenamiento (Ver inciso d)

#### **a. Área de multiplicación**

En esta área se realiza el trabajo de escisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo; cuenta con cámaras de flujo laminar para la manipulación del material vegetal en condiciones de asepsia.

La micropropagación de los cultivos manejados generalmente comprende de cuatro etapas en el área de multiplicación:

- **Etapas 0:**

Es una etapa preparativa del material vegetal, el objetivo es obtener buenas condiciones higiénicas y fisiológicas del material vegetal inicial. Comprende la desinfección, siembra y posterior selección de material no contaminado.

- **Etapas 1:**

Etapas de iniciación de cultivos, se pretende obtener un comienzo estable; se selecciona el material vegetal no contaminado y con características deseables provenientes de la etapa 0.

- **Etapas 2:**

Se da la multiplicación de brotes; la función primordial en esta etapa es incrementar y mantener las variedades o material. Las macollas o grupo de renuevos provenientes de la etapa 1 generalmente se fragmentan en dos.

- **Etapas 3:**

Se pretende la elongación de brotes, inducción y desarrollo de raíces; a través de la suplementación de diferentes reguladores de crecimiento en los medios de cultivo.

**b. Área de lavado**

Área donde se realiza el lavado del material y cristalería utilizados para la preparación y distribución del medio de cultivo; cuenta con una máquina de lavado a vapor, un lavadero y basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se desecha.

**c. Área de entrada y salida de material vegetal**

Área en la que se selecciona y dispone la salida del material vegetal para su posterior aclimatación en el área de crecimiento del invernadero; además se realiza una desinfección previa al material vegetal antes del ingreso al área de multiplicación.

**d. Área de almacenamiento**

Dentro del laboratorio se cuenta con dos bodegas una interna y otra externa. En la primera se almacena la cristalería y reactivos utilizados en el área de preparación y distribución de medios de cultivo. En la externa se almacena principalmente equipo de limpieza y otros materiales como Cloro, alcohol y recipientes de reactivos vacíos.

**e. Área de desarrollo de plantas**

Esta se encarga de proporcionar un control de la temperatura (20 a 28°C), de iluminación (1000 a 5000 lux) y de humedad relativa (70 a 80%) a las plantas en crecimiento, las plantas se encuentran ubicadas sobre estantes de metal, y para cultivos en agitación se poseen dos mesas de agitación. Actualmente dentro del laboratorio se está implementando la etapa de desarrollo de plantas en biorreactores de inmersión temporal (BIT).

El laboratorio posee dos salas de desarrollo, en la sala uno se ubica principalmente el cultivo de caña de azúcar, en la sala dos se ubican otros cultivos, principalmente orquídeas.

#### 1.6.4 Cultivos manejados

Principalmente los cultivos que se manejan dentro del laboratorio de propagación son: Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.), Orquídeas, Gusnay (*Spathiphyllum* sp) y, Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*).

La caña de azúcar es el cultivo que en mayor porcentaje se produce dentro del laboratorio, puesto que es el cultivo que genera la principal actividad productiva del Ingenio Magdalena, el resto de cultivos (Orquídeas, Vetiver y Gusnay), no representan una alta proporción en comparación a la caña de azúcar, sin embargo generan ingresos económicos al laboratorio. Por lo que cada uno de los cultivos es propagado en diferentes proporciones, dichas proporciones de producción se muestran en la Figura 7.

#### 1.6.5 Principales medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados dentro del laboratorio son modificaciones del medio Murashige y Skoog (MS) para cada una de las variedades de caña de azúcar trabajadas; modificaciones que la empresa considera irrevelables.

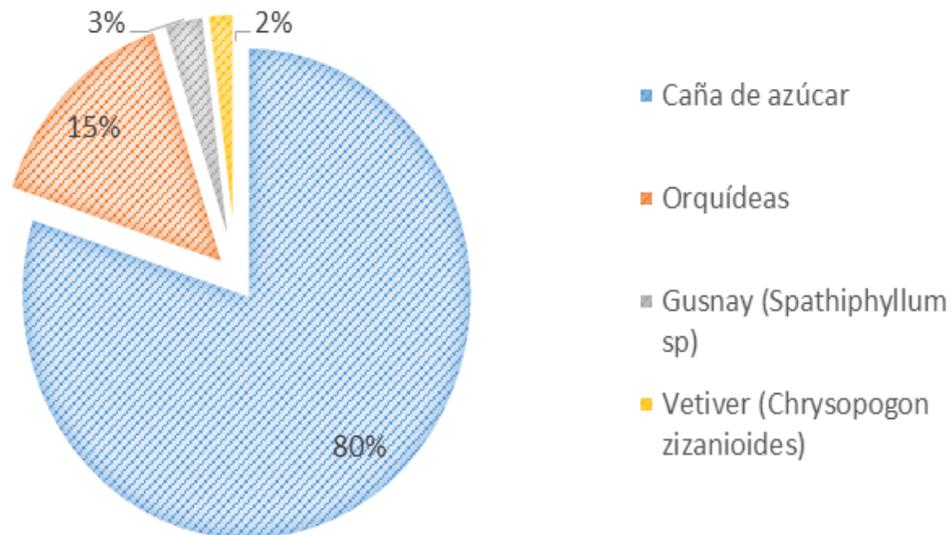


Figura 7. Proporciones de plantas que se producen dentro de la Biofábrica.

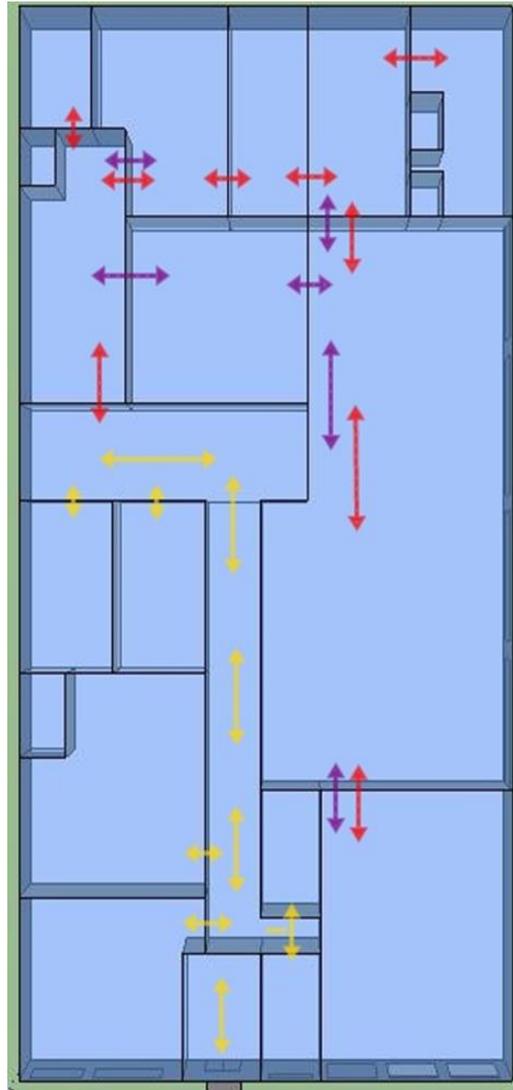
### 1.6.6 Manejo de contaminación

Dentro del laboratorio se tienen ciertas normas para prevenir la contaminación, algunas de ellas son:

- a. Prohibido el ingreso con zapatos que sean ajenos al laboratorio, para cada una de las zonas (controlada y no controlada) se cuenta con un par de zapatos disponibles a utilizar en cada zona.
- b. Antes de ingresar a las zona controlada, es obligatorio ducharse y el uso de uniforme específico de trabajo.
- c. Dentro del área de multiplicación, es obligatorio el ingreso utilizando bata, gorro y mascarilla.
- d. No ingresar al laboratorio si con anterioridad se trabajó en área de campo, evitando contaminación cruzada.
- e. Obedecer las rutas de movilización dentro del laboratorio (Figura 8).
- f. Eliminar frascos con plantas que presenten contaminación.
- g. Eliminar frascos con medio de cultivo que presenten contaminación.
- h. Evitar la apertura de frascos con presencia de hongos y/o bacterias en cualquiera de las áreas.

Para determinar si existe contaminación en las áreas del laboratorio, semanalmente se realiza un plaqueo, catalogando los resultados como alto, medio o bajo, según sea el grado de contaminación de hongo o bacteria.

En caso de que exista contaminación en alguna de las salas, se debe realizar una limpieza mecánica a fondo, seguidamente se realiza una desinfección con un desinfectante fungicida (Clinafarm®) que además se ha demostrado que elimina cocos y bacilos gram (+) (Clinafarm, 2013); de igual manera se realizan aplicaciones de formol para eliminar cualquier otro contaminante.



-  Ruta utilizada sin uso de uniforme específico de trabajo.
-  Ruta utilizada con uso de uniforme específico de trabajo.
-  Ruta utilizada por personas que laboran dentro del área de multiplicación.

Figura 8. Rutas de movilización de las personas dentro del laboratorio.

### 1.6.7 Análisis FODA

Se realizó un análisis FODA, para conocer la situación actual del laboratorio y su entorno, el Cuadro 1 muestra las Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas que afectan el desarrollo de las actividades dentro del laboratorio de propagación.

Cuadro 1. Análisis FODA sobre el laboratorio de propagación de plantas.

FORTALEZAS	DEBILIDADES
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Personal con experiencia para la aplicación de las técnicas de cultivo <i>in vitro</i>, asepsia, esterilización y preparación de medios de cultivo.</li> <li>◦ Instalaciones en buen estado y aptas para el desarrollo del trabajo.</li> <li>◦ Manejo de normas internas para evitar contaminación en áreas de trabajo.</li> <li>◦ El laboratorio cuenta con equipo adecuado para la realización de procesos.</li> <li>◦ Implementación de nuevo sistema de Biorreactores para producción de caña de azúcar.</li> <li>◦ El laboratorio pertenece a una empresa con solidez y prestigio, tanto nacional e internacionalmente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ No se cuenta con área de control de calidad de plantas.</li> <li>◦ Los procesos de control de calidad de plantas son deficientes.</li> <li>◦ No se cuenta con área de control de calidad de medios de cultivo.</li> <li>◦ No existen procedimientos estándares para la aplicación de las técnicas de cultivo <i>in vitro</i>, asepsia, esterilización y preparación de medios de cultivo.</li> <li>◦ Baja organización en distribución de tiempos de trabajo.</li> <li>◦ Uso inadecuado de distribución de mensajes.</li> <li>◦ El laboratorio no posee certificación que garantice las buenas prácticas en la empresa para alcanzar la producción masiva y comercialización de vitroplantas (ISO 9001)</li> <li>◦ En periodo de lluvias intensas existía poca capacidad de drenaje de las instalaciones.</li> </ul>
OPORTUNIDADES	AMENAZAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Realización de investigaciones para el mejoramiento de procesos.</li> <li>◦ Planificación de futura ampliación del laboratorio.</li> <li>◦ Existe la capacidad y la disponibilidad de obtener nuevas tecnologías.</li> <li>◦ El cultivo de caña de azúcar ha sido caracterizado con líder en la agroindustria nacional, generando empleos y apertura de mercados para la comercialización de azúcar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Daños a la infraestructura provocados por fenómenos climáticos en su mayoría en invierno.</li> <li>◦ Por altitud sobre el nivel del mar y su cercanía a las costas del Pacífico, durante el año 2013 el área presentó alertas de tsunami.</li> <li>◦ Expansión de otras corporaciones productoras de caña de azúcar.</li> <li>◦ Expansión de otros laboratorios productores de vitroplantas.</li> </ul>

### **1.6.7.1 Análisis de la matriz FODA, de forma analítica**

#### **A. Estrategia FO:**

El laboratorio cuenta con personal capacitado, instalaciones y equipo adecuado para el mejoramiento de los procesos realizados, además con la implementación del nuevo sistema de Biorreactores la capacidad de producción de caña de azúcar aumentará, por lo que la creciente demanda del mercado podrá abarcarse en un mayor grado; por otro lado, la futura ampliación del laboratorio dará la oportunidad de obtener nuevas tecnologías y la realización de investigaciones para hacer más eficientes los procesos existentes.

#### **B. Estrategia FA:**

Con la implementación del sistema de Biorreactores la empresa será más competente en cuanto a otras productoras de caña de azúcar.

#### **C. Estrategia DO:**

El control de calidad es fundamental para la obtención de productos competentes en el mercado, por lo que al obtener una certificación para la producción de vitroplantas y la adquisición de nuevas tecnologías, el laboratorio podrá enriquecer esas áreas deficientes; así mismo al reorganizar el tiempo de trabajo de cada uno de los técnicos y operadores dará la oportunidad de enriquecerse con la realización de nuevas investigaciones para mejorar los procesos de propagación.

#### **D. Estrategia DA:**

Mejorar manejo de drenajes para evitar daños provocados dentro del laboratorio por causa de las fuertes lluvias, por otro lado el control de calidad en los procesos es primordial para la obtención de buenos resultados y con esto será posible optar a algún tipo de certificación de calidad de productos para mejorar su grado competente.

Lo descrito se muestra en la matriz FODA de forma analítica (Cuadro 2), recomendando decisiones estratégicas para el aprovechamiento de las Fortalezas y Oportunidades y reduciendo las Amenazas y Debilidades.

Cuadro 2. Matriz FODA de forma analítica.

Factores Internos Factores externos	FORTALEZAS	DEBILIDADES
<b>OPORTUNIDADES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Aprovechar los recursos disponibles para el mejoramiento de los procesos realizados.</li> <li>◦ Aumentar la producción de caña de azúcar, abarcando en mayor grado la demanda del mercado.</li> <li>◦ Obtener nuevas tecnologías y la realización de investigaciones para eficientar los procesos existentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Adquirir nuevas tecnologías para el mejoramiento de áreas deficientes en control de calidad.</li> <li>◦ Optar a un proceso de certificación para la producción de vitroplantas.</li> <li>◦ Reorganizar tiempos de trabajo</li> </ul>
<b>AMENAZAS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Mejorar el grado de competencia en cuanto a otras productoras de caña de azúcar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Mejorar manejo de drenajes para evitar daños provocados por lluvias.</li> <li>◦ Mejorar control de calidad en procesos, optar por certificaciones de calidad para mejorar el grado competente del laboratorio.</li> </ul>

## 1.7 CONCLUSIONES

- a. Los cultivos que se manejan actualmente son Caña de Azúcar (*Saccharum spp.*), Orquídeas, Gusnay (*Spathiphyllum sp.*), Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), siendo el más importante la Caña de Azúcar con un porcentaje de producción de 80.
- b. El control preventivo que se maneja dentro del laboratorio para disminuir la contaminación es primordialmente el seguimiento de las normas establecidas durante los procesos de trabajo, evitando así el riesgo de contaminación.
- c. Con la realización del análisis y la matriz analítica FODA (Cuadro 1 y Cuadro 2, respectivamente) se logró identificar y nombrar los principales problemas técnicos dentro del laboratorio; por lo que se recomienda tomar en cuenta el análisis de las Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas.

## 1.8 BIBLIOGRAFÍA

1. Clinafarm (en línea). 2013. Perú. Consultado 10 jun. 2014. Disponible en [http://www.msd-animal-health.com.pe/products/clinafarm\\_spray/020\\_detalle\\_del\\_producto.aspx](http://www.msd-animal-health.com.pe/products/clinafarm_spray/020_detalle_del_producto.aspx)
2. Cultivo de tejidos (en línea). 2009. Bogotá, Colombia. Consultado 5 jun. 2014. Disponible en [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/203024/leccin\\_211\\_consideraciones\\_basicas\\_para\\_el\\_establecimiento\\_o\\_planeacion\\_de\\_un\\_laboratorio\\_de\\_cultivo\\_de\\_tejidos\\_vegetales.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/203024/leccin_211_consideraciones_basicas_para_el_establecimiento_o_planeacion_de_un_laboratorio_de_cultivo_de_tejidos_vegetales.html)
3. Diagrama Causa-Efecto (en línea). 2012. Colombia. Consultado 20 mayo 2014. Disponible en <http://ufpsonew.ufpo.edu.co/ftp/pdf/guias/sig/K-SI-SIG-002A.pdf>
4. Flores Tecún, JI. 2012. Evaluación de tres distanciamientos de siembra y cuatro épocas de corte en vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L) Roberty) con fines de producción de biomasa en la finca San Patricio en el municipio de La Democracia, Escuintla, Guatemala, C.A. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, FAUSAC. 92 p.

5. IMSA (Ingenio Magdalena, GT). 2013. Historia (en línea). Guatemala. Consultado 10 jun. 2014. Disponible en [http://imsa.com.gt/sitio/#!/page\\_historia](http://imsa.com.gt/sitio/#!/page_historia)
6. Orozco, H; Soto, GJ; Pérez, O; Ventura, R; Recinos, M. 1995. Estratificación preliminar de la zona de producción de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Guatemala con fines de investigación en variedades. Guatemala, Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. p. 33. (Documento Técnico no. 6).
7. Roca, WM; Mroginski, LA. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 969 p.



**CAPITULO II. EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN  
VITRO DE ANTURIO (*Anthurium andreanum*) EN LA FINCA SAN PATRICIO, LA  
DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C. A.**

## 2.1 PRESENTACIÓN

A nivel mundial el Anturio es una planta ornamental que se comercializa como flor de corte, globalmente existen tres mayores consumidores en el mercado de flores, estos son Europa, Japón y Estados Unidos. En Guatemala, por su ubicación geográfica y su diversidad de zonas ecológicas, es posible producir el Anturio para el mercado nacional y de Estados Unidos. Hasta hoy el Anturio representa empleo y divisas, aunque en poca escala, contando con muy poca área sembrada en el país distribuida en los departamentos de Retalhuleu y Guatemala (Chiroy, 2002).

En Guatemala hay áreas potenciales para producir el Anturio por lo que las perspectivas son buenas y para ello se debe contar con métodos modernos de propagación; por lo que las técnicas de reproducción *in Vitro* han sido ampliamente utilizadas, con vistas a incrementar las tasas de multiplicación en menor tiempo. Debido a la necesidad de establecer una metodología de propagación se propuso la “Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in Vitro* de Anturio (*Anthurium andreanum*)”, y así mismo poder proporcionar una alternativa eficiente y para la propagación masiva en Guatemala.

El cultivo *in Vitro* de Anturio fue desarrollado inicialmente por Pierik en 1974 y posteriormente ha sido abordado por otros investigadores (Kunisaki, 1977, 1980; Geier, 1982; Teng, 1997), en donde se han utilizado diferentes tipos de explantes y variedades en diferentes medios de cultivo, utilizando frecuentemente el medio descrito por Murashige & Skoog (1962) con modificaciones, suplementado con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas para la inducción de callos.

En el laboratorio de Biotecnología del Ingenio Magdalena, a partir de la utilización de explantes de hoja y el uso de dos modificaciones del medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D, BAP y Kinetina, se logró la inducción de callos y la posterior producción de brotes.

## **2.2 MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1 Establecimiento de cultivos vegetales**

El cultivo de tejidos, en su acepción amplia, puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos, células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (García Olmedo & Et.Al, 2010).

Se basa en el principio de totipotencia, Haberlandt (1902), indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta (Calva & Vargas, 2005).

En segundo término, los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo in Vitro de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma (Roca & Mroginski, 1991).

#### **2.2.1.1 Factores que intervienen en el cultivo de tejidos**

##### **A. El inóculo o explante**

Es el órgano, tejido o fragmento de tejido o células, extraído del material parental para iniciar el cultivo in Vitro. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, éste variará de acuerdo al objetivo perseguido. En general, factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes de considerar (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

## B. Factores físicos

- **pH:** El grado de acidez o alcalinidad (pH) del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de plantas, al igual que ocurre en el suelo, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo, el pH adecuado para las plantas estará en un rango de 4.5 a 7.
- **Intercambio gaseoso:** los gases más corrientes O<sub>2</sub> (Oxígeno), con CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono), y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Etileno).
- **La humedad:** en condiciones in Vitro la humedad dentro de los recipientes es casi 100%. Por eso la planta en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula, etc.
- **La luz:** en condiciones in Vitro clásicas, la intensidad y calidad de la luz es muy baja (10 W/m<sup>2</sup> en comparación de condiciones naturales donde la luz puede representar hasta 900 W/m<sup>2</sup>). La calidad de luz también es muy baja y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de ondas. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros. Dos fenómenos importantes dependientes de la luz son: fotosíntesis y fotomorfogénesis.
  - **Fotosíntesis:** es el proceso por el medio del cual las plantas en la presencia de luz, agua y en los cloroplastos incorporan el dióxido de carbono para formar los compuestos orgánicos que le permitirán crecer y reproducirse.
  - **Fotomorfogénesis:** la luz es un factor importante en la morfogénesis. La morfogénesis funciona con la presencia de pigmentos susceptibles a radiación azul y roja. Las funciones más conocidas son las del pigmento susceptible al rojo: fitocromo (rojo 660 nm y rojo lejano 730 nm); expansión foliar, elongación de entrenudos, diferenciación de estomas, síntesis de clorofila, etc.

## C. Medio de cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos (García Olmedo & Et.Al, 2010), sobre o dentro del cual crecen los explantes (inóculos). Para su

uso, el medio de cultivo se esteriliza ya sea en autoclave o por filtración a través de filtros de papel miliporosos.

Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos. En el Cuadro 3 se presentan tres medios que son muy usados en la actualidad. Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- **Carbono:** Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se le reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol (100 mg/l) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos (Roca & Mroginski, 1991).
- **Nutrientes minerales:** Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de Nitrógeno y Potasio. El Nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na<sub>2</sub>EDTA), lo que lo hace disponible es un amplio rango de pH (García Olmedo & Et.Al, 2010).
- **Vitaminas:** Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de Tiamina (Roca & Mroginski, 1991).
- **Reguladores de crecimiento:** En algunos casos se obtienen en los cultivos *in Vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo del medio basal sin reguladores de crecimiento; sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citocininas (Roca & Mroginski, 1991). Estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces y en la germinación de las semillas. Entre las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejidos se encuentra: ácido

indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), 2,4-D, picloram. Entre las citoquininas se encuentra: benzilaminopurina (BAP), la kinetina y zeatina. Las giberelinas y el ácido absícico son también utilizadas en algunos casos.

Cuadro 3. Composición de tres medios básicos usados en el cultivo *in Vitro* de tejidos.

Compuestos	Medio básico <sup>1</sup>		
	MS	N6	B5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650	----	----
KNO <sub>3</sub>	1.900	2.830	2.500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	400	----
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	166	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	----	463	134
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	185	250
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	----	----	150
KI	0,83	0,80	0,75
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	----	----	10,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	1,60	3,00
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30	4,40	----
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	1,50	2,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	----	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	----	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80	27,85	27,80
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30	37,25	37,30
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	----	0,025
Glicina	2,00	2,00	----
Tiamina -HCl	0,10	1,00	10,00
Piridoxina -HCl	0,50	0,50	1,00
Ácido 1,00	Nicotínico	0,50	0,50
Mioinositol	100,00	----	100,00
Sacarosa	30.000,00	50.000,00	20.000,00
PH	5,7	5,8	5,5

<sup>1)</sup> Composición en mg·L<sup>-1</sup>.

MS = Medio de Murashige y Skoog (*Physiol. Plant.* 15: 473 - 97. 1962)

N6 = Medio de Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., y Chu, C. (*Sci. Sinica* 18: 659- 668. 1975)

B5 = Medio de Gamborg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K. (*Exp. Cell Res.* 50: 151 - 158. 1968)

Fuente: (García Olmedo & Et. Al, 2010)

- **Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos):** El agar (entre 0,6 y 1%) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse Agargel (0,40 a 0,60%),

Transferral (2,0-2,60%), Phytigel (0,25- 0,40%), agarosa (0,80-0.90%) y Gelrite (0,10 a 0,20%) (García Olmedo & Et.Al, 2010).

- **Otros compuestos:** Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios. Es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El Carbón activado (0,1 a 5%) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos (García Olmedo & Et.Al, 2010). Una gran variedad de sustancias de composición indefinida han sido utilizadas para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellas se menciona: extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada y jugo de naranja y tomate (Calva & Vargas, 2005).

#### a. Preparación del medio de cultivo

Debido a que el medio de cultivo es uno de los factores más trascendentales en el éxito del proceso es importante trabajar con cuidado y despacio al principio para poder anticipar las consecuencias de cada acción y familiarizarse con el equipo, cristalería, etc. (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

- **Preparación de soluciones madre**

Por lo general, la preparación del medio de cultivo se inicia preparando soluciones concentradas (madre) de uno o más compuestos. Determinado volumen de cada una de estas soluciones se mezclará más tarde para preparar el medio de cultivo final. Es recomendable preparar las soluciones madre en cantidades relativamente altas y con antelación para ahorrar el tiempo y el trabajo que implica pesar cada uno de los ingredientes cada vez que se prepara un medio de cultivo. Además, muchos de los componentes (microelementos, vitaminas, hormonas) son requeridos en pequeñas cantidades, si se multiplica esa cantidad por un determinado número de veces para preparar la solución madre, la labor de pesado será más fácil y más precisa. La concentración de la solución madre debe ser un factor a considerar. Soluciones muy

concentradas tienden a formar precipitados. En algunos casos estos precipitados son el resultado de mezclar sustancias incompatibles, por ejemplo, Calcio y fosfato o sulfato, Magnesio y fosfato. Es recomendable que la solución madre no sea mayor de 100 veces (100X) la concentración final del medio, sin embargo, el volumen de medio a preparar por semana en el laboratorio dará una pauta para considerar el grado de concentración de la solución madre. Si la solución madre presenta precipitados es mejor descartarla ya que no poseerá el balance adecuado de sustancias, alguna proporción de éstas estará en el fondo con el precipitado (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

- **La calidad del agua:** otro punto importante de tener en cuenta es el uso de agua desmineralizada, destilada o bidestilada para la preparación de los medios de cultivo.
- **Almacenamiento de las soluciones madre:** las soluciones madre deben almacenarse en el refrigerador. No se puede dar un dato exacto de cuánto tiempo pueden permanecer almacenadas sin que sufran deterioro, como regla general, los compuestos inorgánicos son más estables que los orgánicos, por lo que se ha recomendado almacenar auxinas y citocininas por un máximo de dos semanas y los otros componentes por dos meses, sin embargo, si se observa un precipitado la solución debe descartarse inmediatamente.

### 2.2.1.2 Tipos de crecimiento *in vitro*

#### A. Crecimiento organizado

Se refiere al cultivo de explantes diferenciados (especializados) que continúan su crecimiento *in Vitro*, manteniendo su estructura normal durante el tiempo de cultivo. Evidentemente, los explantes que presentan esta forma de crecimiento son los órganos (primordios de frutos, yemas vegetativas, yemas florales, raíces, primordios foliares, etc.), no obstante, cualquier otro tejido (como un fragmento de pétalo) puede dar origen a una forma organizada, como un embrión (Medina, 2011).

## **B. Crecimiento desorganizado**

Este tipo de crecimiento se caracteriza porque a partir de fragmentos de tejidos u órganos se produce un tejido sin estructura específica que contiene un número limitado de algunos tipos de células especializadas encontradas en una planta intacta. Un tejido desorganizado (o callo) puede crecer con subcultivos y puede ser mantenido en medio sólido durante varios meses o años. Puede ser usado para iniciar suspensión de células y protoplastos (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

Los callos pueden surgir a partir de cualquier tipo de explante, sobre todo cuando se exponen a altas concentraciones de hormonas del tipo auxínico (Medina, 2011).

Las células del explante, por ejemplo, del parénquima de la hoja, comienzan a dividirse de manera acelerada y desorganizada formando una masa de células denominada callo. Estas células no son ya células parenquimatosas en virtud de que han sufrido una desdiferenciación parcial o total. Los callos pueden ser mantenidos en este estado por largos periodos y transferírseles en forma periódica a medios de cultivos frescos (Garibay, Ramírez, & Munguía, 2004).

### **2.2.1.3 Técnicas de propagación in Vitro**

#### **A. Cultivo de órganos**

Corresponde al cultivo de un órgano de la planta con el fin de propagar la planta. Cultivo de meristemos o de ápices, microestacas, cultivo de embriones.

#### **B. Callos**

Corresponde a un conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células. El callo tiene la peculiaridad de presentar células no diferenciadas para su última función pero que conservan el poder de dividirse (célula meristemática o embriogénica).

### **C. Suspensión de células**

Las suspensiones celulares consisten de células libres y microagregado de células en medio líquido en movimiento.

### **D. Cultivo de protoplastos**

Es el cultivo de células sin pared pectocelulósica. Es decir, células con componentes vivos rodeados solamente por la membrana citoplásmica. Debido a la ausencia de pared celular los protoplastos son adecuados para trabajos en manipulación genética que no serían posibles con plantas o células intactas, además son muy utilizados para estudios fisiológicos, bioquímicos y biofísicos.

### **E. Cultivo de anteras**

Consiste en el cultivo de anteras enteras con polen inmaduro, el polen se divide para formar embriones o callo. Cuando éstos se transfieren a los medios de regeneración se forman plantas. Por lo general el cultivo de anteras se utiliza para la obtención de plantas haploides. Estas se regeneran por medio de la embriogénesis somática a partir del polen, directamente o por la vía de organogénesis a partir de un callo. Algunas veces se cultiva el polen una vez aislado de la antera y se llama cultivo de polen o de microesporas.

## **2.2.2 Morfogénesis**

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in Vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar a un embrión cigótico sin que medie la fertilización de las gametas, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (García Olmedo & Et.Al, 2010).

### **2.2.2.1 Morfogénesis directa o indirecta**

Los procesos de morfogénesis son directos cuando los tallos, raíces, flores o embriones se producen directamente a partir de los tejidos de partida (explante inicial), y es indirecta cuando la regeneración de tallos, raíces, flores o embriones se produce tras un crecimiento desorganizado del tejido que es denominado callo. En la embriogénesis es más frecuente el proceso indirecto pero también puede ocurrir de manera directa (Gisbert Doménech, 2011).

### **2.2.2.2 Embriogénesis somática**

La embriogénesis se refiere a la formación de un embrión somático a partir de células somáticas que no son el producto de la fusión de gametos. Esta terminología fue utilizada por Tokin (1963) para describir la formación de un individuo a partir de una o varias células somáticas. Sin embargo, este fenómeno no debe confundirse con la organogénesis. (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994). La embriogénesis somática se puede obtener directamente a partir de células aisladas o utilizando callos (Medina, 2011).

Todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos *in Vitro*; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Comúnmente se han usado como explantes partes de plántulas como cotiledones, hipocótilos y embriones; adicionalmente, se han usado ápices caulinares, segmentos de tallos, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras; según Ammirato (1983), estos explantes se han usado con éxito para obtener callos embriogénicos en varias especies de la mayoría de las familias de plantas (Roca & Mroginski, 1991).

Los embriones cigóticos inmaduros ha resultado el explante más favorable para inducir la embriogénesis somática en la mayoría de los cereales. En general se puede admitir que entre más joven sea el tejido utilizado (estadio juvenil poco diferenciado) más fácil será desviarlo de su programa genético y así obtener la dediferenciación hacia la formación de embriogénesis somática (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994); sin embargo, Banks (1979), observó que los explantes obtenidos a partir de plantas maduras de *Hedera helix*

formaba callos embriogénicos, mientras que ello no ocurría con explantes de plantas jóvenes.

De acuerdo con Evans et al. (1981) la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de los embriones, de una concentración alta de auxina (generalmente 2,4-D) en el medio. (Roca & Mroginski, 1991).

Las citocininas como el BAP, la kinetina y la zeatina son a veces utilizadas en el medio de inducción de la embriogénesis somática. Sin embargo son mucho más utilizadas en la fase de diferenciación y maduración del embrión somático. (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994)

### **2.2.2.3 Organogénesis**

En contraste con la embriogénesis somática, la organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o a partir de los callos (Roca & Mroginski, 1991).

La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explante que se quiera cultivar *in Vitro* dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra señales aún poco conocidas (Medina, 2011).

La micropropagación es la tecnología más difundida de propagación masiva de plantas vía organogénesis. Consiste en un conjunto de procedimientos asépticos de cultivo de órganos, tejidos o células que permitan la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan (Krikorian, 1991).

Los cultivos diferenciados son más estables genéticamente que los cultivos indiferenciados. A su vez, los cultivos de yemas axilares que provienen de meristemos preexistentes presentan menores índices de variación genética que el cultivo de yemas

adventicias que se originan de nuevo a partir de tejidos somáticos con desarrollo directo o indirecto a través de la formación de callos (Paniego, 1995; Rice et al., 1992).

### **2.2.3 Generalidades del cultivo de Anturio (*Anthurium sp.*)**

#### **2.2.3.1 Clasificación taxonómica**

El *Anthurium* pertenece a la familia de las Aráceas la cual es muy compleja, estando compuesta por más de 3,000 especies, clasificadas en 107 géneros que a su vez se engloban en 8 subfamilias. El *Anthurium* es el género más grande de ésta familia siendo originario de los bosques lluviosos de Colombia, Ecuador y Centroamérica. Se trata de plantas herbáceas y perennes, varían en su hábito de crecimiento en función de la especie, puede ser terrestre y/o epífita. Este género comprende más de 1,000 especies de las cuales las más conocidas y con mayor interés comercial son: *A. andreanum*, *A. scherzerianum*, *A. watermaliense*, *A. crystallium* y *A. clarinerviun* (Anthura, 1998).

Taxonomía del Anturio (Anthura, 1998):

REINO: Plantae  
 SUBREINO: Embryobionta  
 DIVISIÓN: Magnoliophyta  
 CLASE: Liliopsida  
 SUBCLASE: Arecidae  
 ORDEN: Arales  
 FAMILIA: Araceae  
 GENERO: *Anthurium*  
 ESPECIE: *Anthurium andreanum*.

#### **2.2.3.2 Características botánicas.**

Según la descripción de Murguía (1996) las raíces de Anturio son fibrosas, cilíndricas, de consistencia carnosa y no son muy profundas, blancas y produce varias raíces adventicias (Mejía, 2007).

Las hojas de Anturio son alternas, con un pecíolo banalmente envainado y una lamina expandida, simple y entera, de borde liso. Lo que se conoce comercialmente como flor es en realidad una hoja modificada llamada espata.

El tallo de Anturio es caulinar, simple y herbáceo cuando la planta es joven y semileñoso cuando la planta es adulta.

El Anturio posee una inflorescencia en una espádice que se yergue sobre la base de la espata, y que contiene las flores verdaderas; estas son muy numerosas, pequeñas, hermafroditas con un ovario, dos carpelos y cuatro anteras. En el momento en que las flores maduran y están listas para ser polinizadas el espádice aparece húmedo y brillante.

Los frutos del Anturio se presentan como unas protuberancias verrugosas sobre el espádice y son unas bayas globulosas amarillas o rojas que contienen una o dos semillas pequeñas de color amarillo.

### 2.2.3.3 Propagación

El Anturio se puede propagar tanto por semilla como por métodos vegetativos. La reproducción por semilla no es muy eficiente para el Anturio, ya que es muy lenta y tarda unos 9 meses en madurar y las semillas pierden su poder germinativo en cuestión de días. Esta forma de reproducir el Anturio se puede practicar durante todo el año pero requiere de un sustrato de alta porosidad como el musgo o la hierba (Peat Moss), con temperaturas entre 20 y 25 °C y humedad relativa entre 90 a 95% la germinación es lenta y los primeros brotes se observan a los 2 meses después de sembrarla (Anthura, 1998).

Dentro de la reproducción vegetativa que es otro método de multiplicación del Anturio se encuentran los métodos (Arces, 1997):

- **Esquejes apicales:** consiste en remover lo que se llama popularmente la copa de la planta, la cual no debe tener flores, deben cosecharse con equipo desinfectado y sembrarse a mediana profundidad.
- **División de las plantas:** método útil método de reproducción, especialmente en el caso de *A. scherzeranum*, consiste en dividir las plantas, separando estacas o rizomas de 5 a 7 centímetros o comúnmente denominados hijuelos que brotan de las plantas madres.

- **Acodo aéreo:** es la inducción del crecimiento de raíces aéreas y tallos laterales a partir de plantas bien desarrolladas que se han levantado del suelo y tienen las raíces expuestas. Las raíces se envuelven con sustrato con alto contenido de materia orgánica, de manera que cuando las raíces aéreas comienzan a desarrollarse en el medio propagativo, se puede proceder a separar el acodo que será en realidad una planta enraizada.

#### **2.2.3.4 Distribución geográfica del Anturio**

De acuerdo con el taxonomista Engler, quien vivió alrededor del año 1900, habiendo coleccionado y descrito un gran número de variedades. Las variedades de Anturio son comunes a través de Centro y Sur América, el límite del área de distribución termina cerca de México en la ciudad de Orizaba.

Las variedades de Anturio pueden ser encontradas en áreas muy diversas y con amplias diferencias climatológicas. Desde las regiones secas del Oeste de México hasta los bosques lluviosos tropicales de América del Sur. La Altitud está relacionada con las especies, el rango va desde el nivel del mar hasta una altura de 3,000 metros. El mayor desarrollo de los géneros ha tomado lugar en Los Andes, Centro y Sur América entre 10 grados de Longitud y 5 grados de Latitud con una temperatura mínima de 10°C (Anthura, 1998).

### **2.3 MARCO REFERENCIAL**

#### **2.3.1 Cultivo *in Vitro* de *Anthurium andreanum***

Según Puchooa, (2003) el método para la producción *in Vitro* de plántulas de *Anthurium andreanum* fue desarrollado en principio por Pierik et al., (1974); la micropropagación de *Anthurium* ha sido llevada a cabo con la utilización de varios explantes, los cuales son resumidos en el Cuadro 4 (Mejía, 2007).

Cuadro 4. Origen de los explantes y respuestas obtenidas en el cultivo *in Vitro* de *Anthurium andreanum* (Mejía, 2007)

TIPOS DE EXPLANTE	RESULTADO	REFERENCIA
Raíz	Regeneración de plantas completas	Chen, (1997)
Embriones somáticos primarios	Embriones somáticos secundarios	Adelhied, (1992)
Cortes de raíz trasformada con <i>A. tumefaciens</i> transmitiendo el vector binario pCa2Att	Plantas completas resistentes a kanamicina	Chen, (1997)
Semillas maduras completas	Embriones zigóticos	Matsumoto, (1998)
Semillas germinadas	Callos	Vargas et al., (2004)
Embriones zigóticos	Protoplastos	Adelhied, (1997)
Brotos adventicios	Callos	Te-Chato et al., (2006)
Callos	Embriones	Adelheid et al., (1992)
	Regeneración directa	Te-Chato et al., (2006)
	Callos organogénicos	Adelheid et al., (1992)
Hojas		Pierik, (1990)
	Callos embriogénicos	Adelhied et al., (1992)
	Callos y brotes	Geier, (1986)

### 2.3.1.1 Regeneración directa e indirecta

La regeneración directa excluye cualquier tipo de desdiferenciación celular, es decir, no se observa en ningún momento la formación de callo produciendo plantas completas o casi completas (embriones). La regeneración indirecta tiene como características el crecimiento y desarrollo desorganizado y la posterior formación de callo.

En el Cuadro 5 se muestran los diferentes tipos de explantes desde los cuales se ha logrado la obtención de plántulas completas a través de la regeneración directa e indirecta. Este tipo de proceso es común con los resultados de diferentes estudios *in Vitro* realizados por un gran número de investigadores; sin embargo los explantes de hoja son el punto de convergencia de muchos investigadores, es decir, con ellos se ha corroborado en mayor número la producción de plántulas completas (Mejía, 2007).

La Figura 9 representa tres rutas a partir de la desdiferenciación para obtener plántulas mediante la regeneración indirecta, dos de los procesos relacionan embriones somáticos desde fuentes diferentes: células y callos embriogénicos; la última ruta recurre con los procesos de organogénesis.

Cuadro 5. Explantes utilizados para la regeneración directa e indirecta de plántulas de *Anthurium sp.* (Mejía, 2007)

Explante	Referencia
Brotos axilares	Te-Chato et al., (2006) Adelheid et al., (1992)
Brotos adventicios	Vargas et al., (2004); Aldelheid, (1992)
Hojas	Musa, (1997); Geier, (1986); Aldelheid, (1992)
Cultivo de callos embriogénicos desde peciolo	Te-Chato et al., (2006); Chen, (1997)
Embriones somáticos derivados de cortes de explante de hojas cultivadas <i>in vitro</i>	Puchooa, (2003); Adelheid et al., (1991)
Plántulas cultivadas <i>in vitro</i>	Adelheid et al., (1992); Geier, (1986)
Yemas	Musa, (1997)
Nudos e internudos	Chen, (1997); Adelheid, (1992)
Tallos	Te-Chato et al., (2006); Adelheid et al., (1992)
Semillas	Te-Chato et al., (2006)
Espádice	Te-Chato et al., (2006)
Espata	Chen, (1997)
Raíz	Chen, (1997)

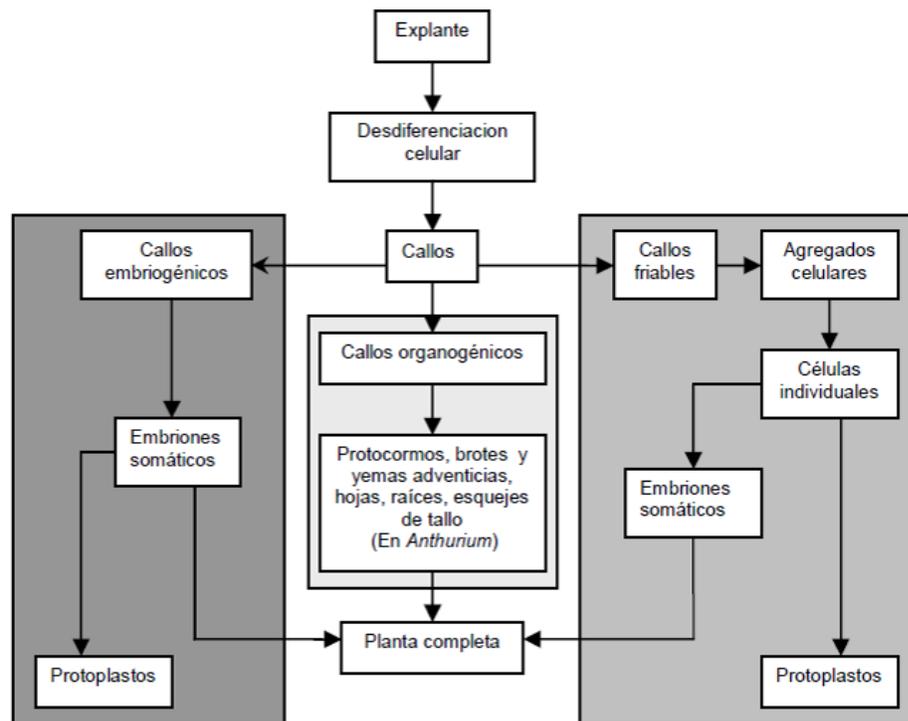


Figura 9. Diagrama de regeneración indirecta en *Anthurium* (Te-Chato et al., 2006; Chen, 1997; Adelheid et al., 1992).

### 2.3.2 Ensayos realizados para la propagación *in Vitro* de Anturio

- a) En el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila lograron la formación de callos por medio del uso de segmentos de hojas jóvenes de plantas de un año de edad utilizando el medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog (1962), modificado con 0.950 g/L de  $\text{KNO}_3$  y 0.825 g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , se han obtenido los mejores resultados con la combinación de 0.08 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de BAP. En la regeneración y multiplicación de plantas el mejor resultado se logró con 3 mg/l de BAP. (Reinaldo Trujillo Sánchez, 2000).
- b) En el Instituto de Biotecnología, Villa Clara, Cuba han estudiado la embriogénesis somática indirecta en Anturio var. Lambada, los explantes utilizados provenían de plantas *in Vitro* obtenidas por organogénesis indirecta; los medios de cultivo empleados fueron Murashige & Skoog y Nitsch y Nitsch modificados y suplementados con tiamina 0.4 mg/l, mio-inositol 100 mg/l y sacarosa 3%. Para la inducción de callos se han obtenido los mejores resultados con la combinación de 6.79  $\mu\text{M}$  de 2,4-D más 2.32  $\mu\text{M}$  de Kinetina; para la formación y diferenciación de embriones somáticos han logrado los mejores resultados con la combinación de 4.4  $\mu\text{M}$  de BAP. (Bautista, Peñalver, Rodríguez, Camacho, & Peralta, 2008).
- c) Del mismo modo en el Instituto de Biotecnología, Villa Clara, Cuba, también se ha logrado la inducción de callos en segmentos de hoja de tres variedades de Anturio; Lambada, Tropical y Sonate, el medio de cultivo utilizado fue el MS. En el caso de la variedad Lambada se obtuvo la mejor formación de callos con la combinación de 0.18 mg/l de 2,4-D más 1.1 mg/l de BAP, la variedad Tropical con 0.13 mg/l de 2,4-D más 1.1 mg/l de BAP y en la variedad Sonate la callogénesis se favoreció con 0.18 mg/l de 2,4-D más 2.2 mg/l de BAP (Bautista, Peñalver, Rodríguez, Camacho, & Peralta, 2006).
- d) Te-Chato et al., (2006) citado por Mejía (2007). realizaron cortes a manera de laceraciones en explantes de tallos de tres variedades de Anturio los cuales fueron cultivados sobre el medio Murashige y Skoog a la mitad de concentración

suplementado con 3% de sacarosa, 0.5 mg/l de TDZ y 0.5 mg/l de BA; entre las variedades estudiadas Valantino tuvo un 83.73% en inducción de callos, Sonat con 78.67% y Plew Phuket con 45.60%.

- e) Pierik, (1990) citado por Mejía (2007) determinó que si los callos de *Anthurium andreanum* se cultivan en medio líquido, solamente se forman raíces adventicias en contraste con su cultivo en medio sólido donde se observan fenómenos de organogénesis.

### **2.3.3 Aspectos considerados para la evaluación de callos**

Además de la evaluación de inducción o formación de callos en los explantes, también es importante considerar características tales como color, forma, tipo (embriogénico u organogénico) consistencia (friable o compacta) y desarrollo de los mismos, entre otras.

Para la evaluación del desarrollo de los callos, se ha utilizado como referencia la escala de Santana (1982), la cual clasifica los callos en tres diferentes grados:

- Grado 1 = ligera formación del callo (observación de una débil proliferación en zonas del borde del explante).
- Grado 2 = formación del callo (hay proliferación de células por todos los bordes del explante, sin llegar a formar una masa).
- Grado 3 =abundante formación del callo (formación de una masa voluminosa de callos)

### **2.3.4 Lugar y condiciones del lugar**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Ingenio Magdalena (BIOMAG), ubicado en la finca San Patricio km 99.5 carretera a Sipacate, La Democracia, Escuintla (Ver Capítulo I)

La investigación se llevó a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio, dentro del cual se manejan dos salas de desarrollo de plantas con diversos cultivos, dentro de los cuales es posible mencionar: Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*), Orquídeas, Gusnay (*Spathiphyllum sp.*), Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*); cada sala de desarrollo de plantas posee iluminación artificial controlada (3,000 lux por 16 horas luz), y temperatura de  $25\pm 2$  °C.

## **2.4 OBJETIVOS**

### **2.4.1 General**

Regenerar *in Vitro* plantas de Anturio (*Anthurium andreanum*) bajo las condiciones del laboratorio de Biotecnología del Ingenio Magdalena, La Democracia, Escuintla.

### **2.4.2 Específicos**

- a. Evaluar dos concentraciones de 2,4-D, dos de BAP y dos de Kinetina en dos modificaciones del medio MS en la inducción de callos a partir de explantes de hoja de Anturio, a las 18 semanas después de la siembra.
- b. Determinar el medio de cultivo que induzca mayor porcentaje de callos en grado de desarrollo tres utilizando la Escala de Santana.
- c. Evaluar los reguladores de crecimiento BAP e IBA en el medio de cultivo MS en la producción de brotes a partir de callos de Anturio.

## **2.5 HIPÓTESIS**

- a. A partir de explantes de hoja de Anturio la combinación de reguladores de crecimiento 2,4-D, BAP y Kinetina en el medio de cultivo MS, inducen la formación de callos con un grado de desarrollo tres (3) de la Escala de Santana.
- b. A partir de callos, la combinación de los reguladores de crecimiento, BAP e IBA, en medio de cultivo MS, inducen la producción de brotes de Anturio.

## 2.6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.6.1 Materiales y equipo

A continuación se presentan los materiales y equipo utilizado dentro de la metodología llevada a cabo:

- Agua destilada
- Tubos de ensayo
- Hipoclorito calcio
- Papel aluminio
- Soluciones madre
- Alcohol
- Pinzas
- Frascos de vidrio
- Bisturís
- Jabón Tween 20®
- Tijeras de podar
- Autoclave
- Potenciómetro
- Marcadores
- Balanza analítica
- Reguladores de crecimiento
- Beackers
- Probetas
- Reactivos
- Agua esterilizada
- Atomizadores
- Cámara de flujo laminar
- Cinta adhesiva

### 2.6.2 Metodología

#### 2.6.2.1 Fases de la investigación

La investigación se desarrolló en las siguientes fases:

- Fase I: inducción de callos, etapa de iniciación que consistió en la siembra de los explantes, constituidos por segmentos de hojas jóvenes, en los diferentes medios de cultivo; esta fase se desarrolló en condiciones de completa oscuridad a  $25\pm 2$  °C dentro de la sala de desarrollo.
- Fase II: formación de brotes, se inició a las 24 semanas de haber iniciado la investigación; consistió esencialmente en sembrar secciones de callos provenientes de la fase I en diferentes medios de cultivo, en condiciones de luz artificial ((3,000 lux por 16 horas luz) a  $25\pm 2$  °C.

## A. Fase I: inducción de callos

### a. Descripción de tratamientos

Los componentes de los tratamientos evaluados fueron:

- Medio basal MS con dos diferentes modificaciones (Cuadro 12A y Cuadro 13A):
  - Macronutrientes reducidos al 50%
  - $\text{NH}_4\text{NO}_3$  reducido a 200 mg/l y  $\text{KNO}_3$  reducido a 950 mg/l
- Ocho combinaciones de reguladores de crecimiento, dos diferentes concentraciones de 2,4-D (0.1 mg/l y 0.5 mg/l), cada una de ellas combinadas con dos diferentes concentraciones de BAP (0.5 mg/l y 1 mg/l) y dos concentraciones de Kinetina (0.5 mg/l y 1 mg/l); el Cuadro 6 muestra las combinaciones realizadas:

Cuadro 6. Combinaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de callos.

0.1 mg/l 2,4-D	0.5 mg/l BAP
	1 mg/l BAP
	0.5 mg/l Kinetina
	1 mg/l Kinetina
0.5 mg/l 2,4-D	0.5 mg/l BAP
	1 mg/l BAP
	0.5 mg/l Kinetina
	1 mg/l Kinetina

Los tratamientos estuvieron conformados por la combinación del medio basal MS y reguladores de crecimiento (Cuadro 7); es decir, cada una de las modificaciones del medio basal MS, se combinaron con las ocho diferentes composiciones de reguladores de crecimiento; es así que 8 de los tratamientos obtenidos contenían el medio basal MS con los Macronutrientes reducidos al 50%, de los cuales, 4 poseían 0.1 mg/l de 2,4-D más

BAP o Kinetina (según la combinación correspondiente) y los otros 4 poseían 0.5 mg/l de 2,4-D más BAP o Kinetina (según la combinación correspondiente); de igual manera se realizó con el medio basal MS con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  reducido a 200 mg/l y  $\text{KNO}_3$  reducido a 950 mg/l, obteniendo así un total de 16 medios de cultivo, cada uno con un medio basal más auxina (2,4-D) más citocinina (BAP o Kinetina).

Cuadro 7. Medios de cultivo evaluados en la fase de inducción de callos.

No.	Medio de Cultivo		
1	MS (Macros reducidos al 50%)	0.1 mg/l 2,4-D	0.5 mg/l BAP
2			1 mg/l BAP
3			0.5 mg/l Kinetina
4			1 mg/l Kinetina
5		0.5 mg/l 2,4-D	0.5 mg/l BAP
6			1 mg/l BAP
7			0.5 mg/l Kinetina
8			1 mg/l Kinetina
9	MS (200 mg/l de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ y 950 mg/l de $\text{KNO}_3$ )	0.1 mg/l 2,4-D	0.5 mg/l BAP
10			1 mg/l BAP
11			0.5 mg/l Kinetina
12			1 mg/l Kinetina
13		0.5 mg/l 2,4-D	0.5 mg/l BAP
14			1 mg/l BAP
15			0.5 mg/l Kinetina
16			1 mg/l Kinetina

#### b. Variables respuestas

- Porcentaje de formación de callos por tratamiento.
- Desarrollo de callos
- Consistencia de callos

#### B. Fase II: formación de brotes

##### a. Descripción de tratamientos

Los componentes de los tratamientos evaluados fueron:

- Medio del cultivo MS
- Mejor tratamiento en desarrollo de callos de la fase I.
- Cuatro combinaciones de reguladores de crecimiento: en una de las combinaciones solamente se utilizó 1 mg/l de BAP, tres combinaciones utilizando 0.05 mg/l de IBA con tres diferentes dosis de BAP (0.6, 1 y 3 mg/l); dichas combinaciones se muestran en el Cuadro 8:

Cuadro 8. Combinaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de brotes.

1mg/l BAP	
0.05mg/l IBA	0.6mg/l BAP
	1mg/l BAP
	3mg/l BAP

Los tratamientos estuvieron conformados por la combinación del medio basal MS y las cuatro composiciones de reguladores de crecimiento (Cuadro 9), haciendo un total de 4 medios de cultivo.

Cuadro 9. Medios de cultivo evaluados en la fase de regeneración de brotes.

No.	Medio de Cultivo		
1	Medio basal MS	1mg/l BAP	
2		0.05mg/l IBA	0.6mg/l BAP
3			1mg/l BAP
4			3mg/l BAP

#### b. Variables respuestas

- Porcentaje de formación de brotes.
- Número promedio de brotes por callo.
- Tamaño de brotes

### **2.6.2.2 Elaboración, distribución y esterilización de medios de cultivo**

Se procedió a preparar soluciones stock de Macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, FE-EDTA y compuestos orgánicos; seguidamente se agregó la cantidad necesaria de cada solución para la elaboración de los diferentes medios de cultivo a evaluar (Cuadro 7).

Posteriormente el medio de cultivo fue distribuido en frascos de vidrio, agregando 30 mL de a cada frasco de 250 ml; los frascos debidamente tapados se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120 °C y 15 libras por pulgada cuadrada de presión.

### **2.6.2.3 Recolección y desinfección del material vegetal**

Para el montaje del ensayo (fase I) se recolectaron hojas jóvenes de plantas sanas de Anturio variedad White Bauty (Figura 10), las cuales se encontraban bajo condiciones de invernadero; ya ingresadas al laboratorio fueron sometidas a un proceso de lavado con agua corriente durante 10 minutos; posteriormente, haciendo uso de una cámara de flujo laminar, las hojas se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio al 2% más 4 gotas de Tween 20®/L, manteniendo agitado durante 15 minutos, finalmente se procedía a un triple lavado con agua destilada estéril.



Figura 10. Hojas jóvenes seleccionadas para la propagación *in Vitro* de Anturio.

#### 2.6.2.4 Siembra e incubación

Inmediatamente después de realizada la desinfección del material, cada una de las hojas se colocaron sobre papel filtro estéril cortando segmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, con ayuda de pinzas y bisturí esterilizados.

Posteriormente, se realizó la siembra en cada uno de los medios de cultivo; el explante se colocó de forma vertical con un tercio del mismo sumergido en el medio.

Seguido a la siembra de los explantes, los frascos fueron colocados en la oscuridad a 25±2 °C, para inducir la formación de callos.

Después de transcurridas 18 semanas, los frascos fueron trasladados a un estante sin luz artificial (luz natural) dentro del laboratorio; después de haber transcurrido seis semanas en esas condiciones, fue seleccionado el mejor tratamiento en cuanto al desarrollo de callos; el desarrollo de los callos fue evaluado por medio de la escala de Santana (1982).

El tratamiento con mayor porcentaje en desarrollo de callos en grado 3, fue seleccionado para proceder a la fase II; los callos obtenidos fueron fraccionados uniformemente (se obtuvieron fracciones aproximadamente de 2 cm<sup>3</sup>) y seguidamente se transfirieron a los diferentes medios de cultivo para la fase II.

#### 2.6.2.5 Toma de datos

Transcurridas 18 semanas después de la siembra de los explantes (fase I), se obtuvo el porcentaje de formación de callos por tratamiento evaluado, este se obtuvo de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Explantes con formación de callos}}{\text{Explantes sembrados}} * 100$$

La consistencia de los callos fue catalogada como friable o compacto; además se consideraron aspectos como color, presencia de brotes y contaminación.

Después de 3 meses de inicio de la fase II, se obtuvo el porcentaje de formación de brotes en los callos, este porcentaje se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Callos con presencia de brotes}}{\text{Número de callos por tratamiento}} * 100$$

Además se obtuvo el número de brotes por callo, para esto se tomó una muestra del 25% de los callos existentes por tratamiento, en el Cuadro 10 se muestra el número de callos existentes y el tamaño de muestra correspondiente para cada tratamiento.

Cuadro 10. Callos existentes y tamaño de muestra obtenida por tratamiento.

Medio de Cultivo	Callos existentes	Tamaño de muestra (25%)
MS más 1 mg/l de BAP	22	5
MS con 0.05 mg/l de IBA más 0.6 mg/l de BAP	31	8
MS con 0.05 mg/l de IBA más 1 mg/l de BAP	38	9
MS con 0.05 mg/l de IBA más 3 mg/l de BAP	24	6

La selección de la muestra se realizó aleatoriamente y se procedió a contar el número total de brotes por callo, obteniendo un número promedio de brotes por tratamiento.

Es importante mencionar que se consideraron como brotes aquellos que presentaban al menos 5 mm de altura y que poseían un mínimo de dos hojas formadas (Figura 11).



Figura 11. Parámetro estimado para el conteo de brotes.

El tamaño de brotes se clasificó en tres categorías, las cuales son:

- Categoría A: brotes no mayores de 1 cm.
- Categoría B: brotes mayores de 1 cm y menores de 2 cm.
- Categoría C: brotes mayores de 2 cm.

Posteriormente se obtuvo el porcentaje de brotes en cada una de estas categorías (Figura 12).

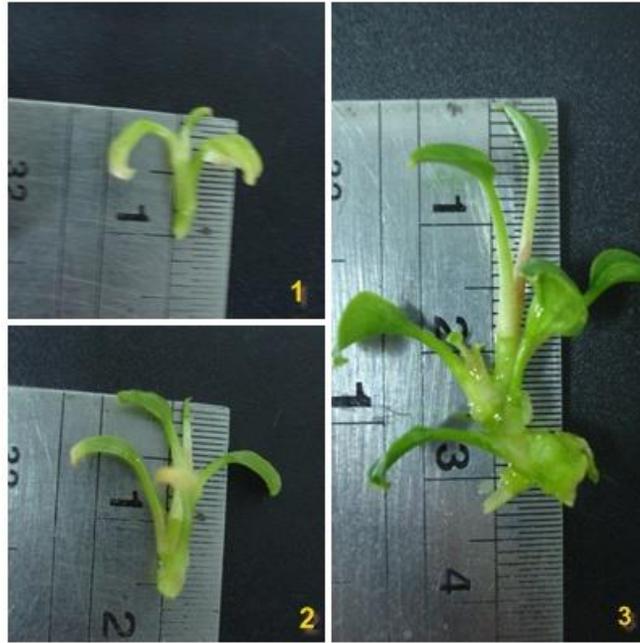


Figura 12. (1) Brotes no mayores a 1 cm, (2) brotes mayores a 1 cm y menores de 2 cm, (3) brotes mayores a 2 cm.

La metodología que se utilizó durante la investigación se resume en la Figura 13.

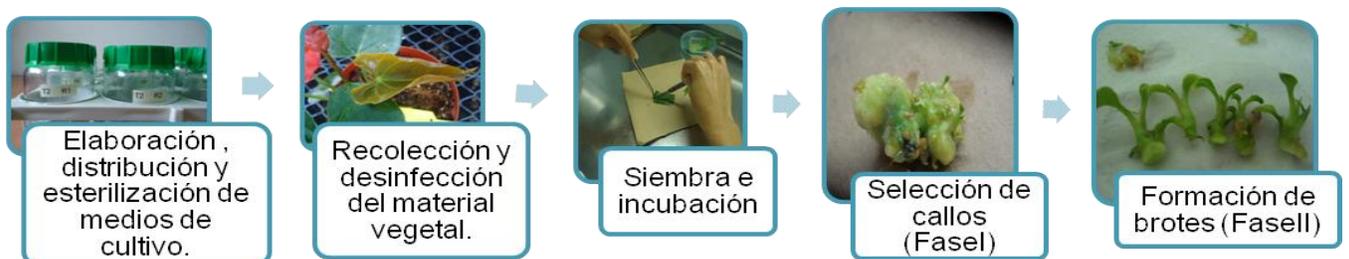


Figura 13. Metodología utilizada para la propagación *in Vitro* de Anturio.

## 2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.7.1 Fase I: Inducción de callos

A partir de la cuarta semana de haber realizado la siembra se observaron cambios en la estructura de los segmentos de hojas; en los bordes en donde se realizaron los cortes se pudo observar pequeñas aberturas (ligera formación de callo) y en las nervaduras pequeños engrosamientos como una pequeña masa de células traslúcidas; a partir de las 10 semanas ya fue posible observar la formación de callos en la mayoría de los bordes de los explantes, en algunos ya existía una abundante formación de masa voluminosa de callos (Figura 14). Los callos presentaban un color amarillo claro, unos con apariencia espumosa, traslúcidos y poseían estructuras nodulares.

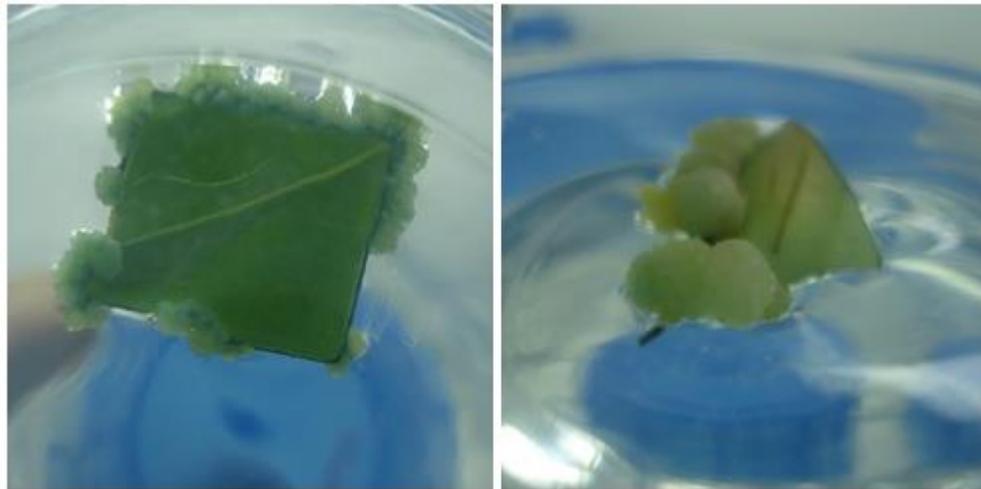


Figura 14. Explantes con proliferación de callos en bordes (izquierda); callos con abundante formación de masa de células (derecha).

Al finalizar la fase I y consecuentemente el cálculo de los porcentajes de formación de callos para cada medio de cultivo, el 71.43% de los explantes formaron callos en el medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$  combinado con 0.1 mg/l de 2,4-D más 0.5 mg/l de BAP; el segundo valor en porcentaje obtenido fue de 64.29% en el medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$  combinado con 0.1 mg/l de 2,4-D más 1 mg/l de BAP. El menor valor obtenido corresponde al uso del medio basal MS

con los Macronutrientes reducidos al 50% suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D más 1 mg/l de BAP con un 10.71%; en la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos.

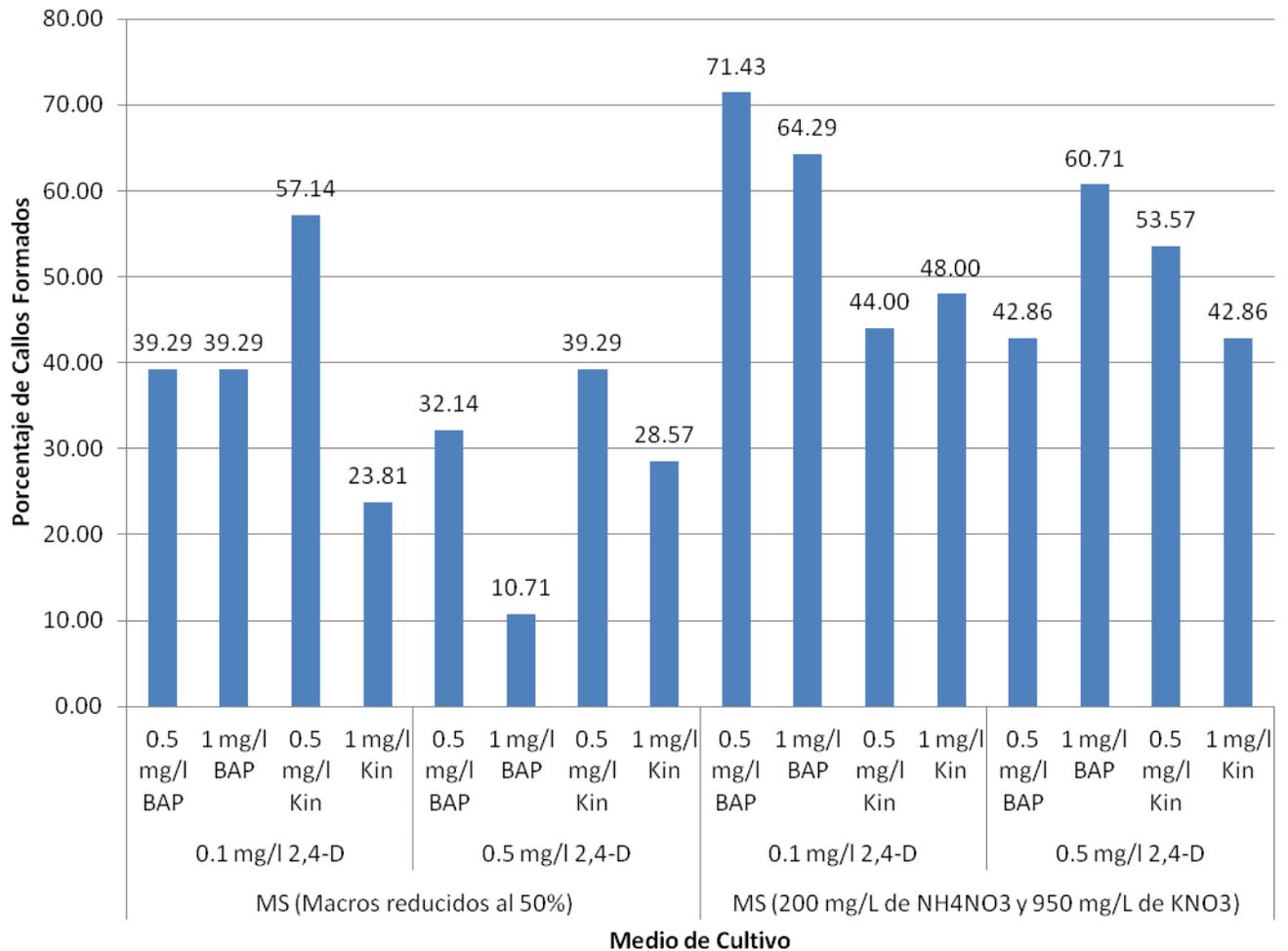


Figura 15. Porcentaje de formación de callos en segmentos de hojas de *Anthurium andreaeanum* para cada uno de los medios de cultivo utilizados.

La inducción de callos en cada uno de los tratamientos se vio afectada por la contaminación microbiana existente y la muerte de explantes; durante la fase de inducción de callos, se obtuvo un 38.62% de contaminación acumulada para los tratamientos. En la Figura 16 se muestra la curva de contaminación en el tiempo, esta contaminación pudo provocarse por factores como ambiente, manipulación, desinfección, entre otros.

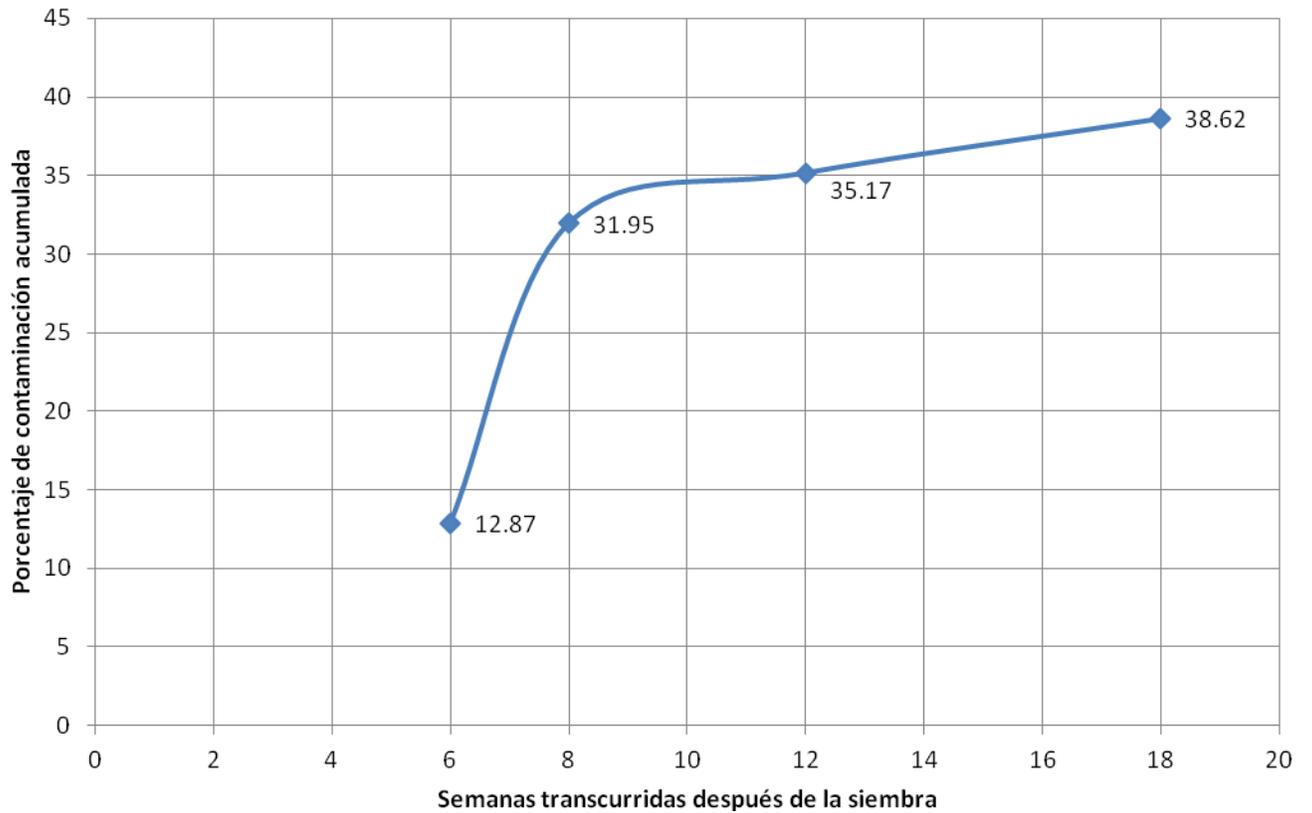


Figura 16. Porcentaje de contaminación acumulada obtenida durante la fase I.

Para cada uno de los medios de cultivo evaluados se obtuvo el grado de desarrollo de los callos formados, esta variable se midió por medio de la escala de Santana; en la Figura 17 se observan los tres diferentes grados de formación de callos, en la imagen 1 se encuentra sobre los bordes del explante una ligera proliferación de callo (grado 1), en la imagen 2 la formación de callo es un poco más abundante, llegando a cubrir la totalidad de los bordes del explante (grado 2) y por último en la imagen 3 la formación de callo es abundante, llegando a formar una masa de células, cubriendo parcial o totalmente el explante (grado 3).

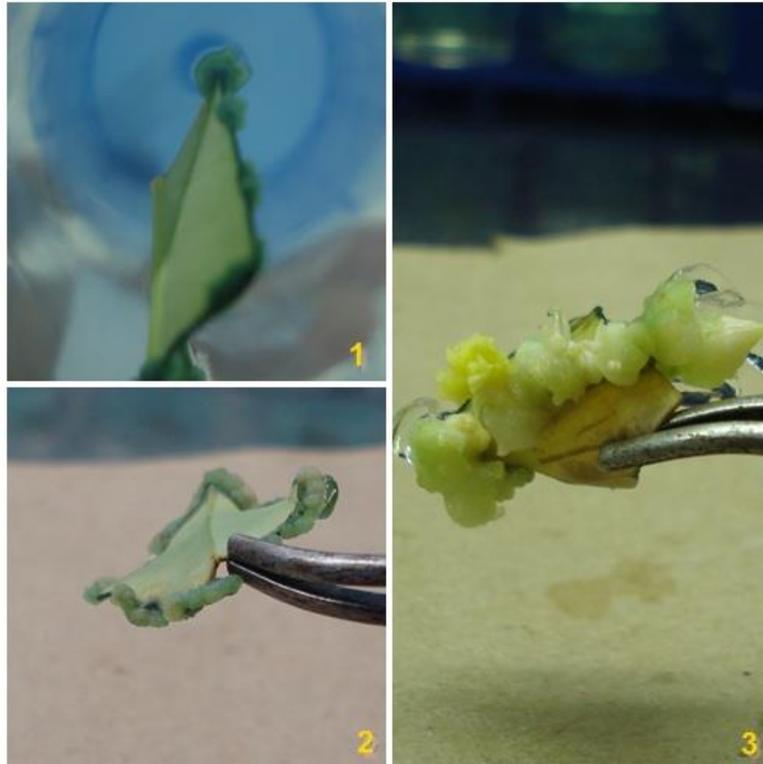


Figura 17. Grado de desarrollo de los callos formados según escala de Santana: (1) ligera formación de callo, grado 1; (2) formación de callo, grado 2; (3) abundante formación de callo, grado 3.

Se realizó la clasificación de los callos formados en cada uno de los medios de cultivo, obteniendo el mayor porcentaje (88.89%) con un grado de desarrollo 3, corresponde al medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$  suplementado con 0.1 mg/l 2,4-D más 1 mg/l de BAP, medio de cultivo que presentó un 11.11% de callos en grado de desarrollo 2 y un 0% en grado de desarrollo 1.

En cuanto a los explantes que generaron callos con un grado de desarrollo 2 (90%) fue el medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$  suplementado con 0.1 mg/l 2,4-D más 0.5 mg/l de BAP.

En el Cuadro 11 se muestra la clasificación de los callos obtenidos para cada uno de los grados de la escala de Santana por tratamiento.

Cuadro 11. Clasificación de callos según escala de Santana.

Medio de Cultivo	Total de callos desarrollados	Cantidad de callos desarrollados según Escala de Santana			Porcentaje de callos desarrollados, según Escala de Santana		
		G1	G2	G3	G1	G2	G3
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l BAP	11	7	2	2	63.64	18.18	18.18
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l BAP	11	3	6	2	27.27	54.55	18.18
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l Kin	16	6	9	1	37.5	56.25	6.25
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l Kin	5	4	1	0	80	20	0
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l BAP	9	5	3	1	55.56	33.33	11.11
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l BAP	3	2	1	0	66.67	33.33	0
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l Kin	11	9	2	0	81.82	18.18	0
MS (Macros reducidos al 50%) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l Kin	8	5	3	0	62.5	37.5	0
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l BAP	20	2	18	0	10	90	0
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l BAP	18	0	2	16	0	11.11	88.89
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l Kin	11	3	8	0	27.27	72.73	0
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.1 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l Kin	12	4	8	0	33.33	66.67	0
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l BAP	12	7	5	0	58.33	41.67	0
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l BAP	17	2	3	12	11.76	17.65	70.59
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 0.5 mg/l Kin	15	10	5	0	66.67	33.33	0
MS (200 mg/l de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y 950 mg/l de KNO <sub>3</sub> ) con 0.5 mg/l 2,4-D Y 1 mg/l Kin	12	9	3	0	75	25	0

Existe una notable diferencia entre la cantidad de callos formados y su grado de desarrollo, debido a que no existe una relación directa entre la formación y el desarrollo de los mismos, puede ocurrir una formación de callos en donde el 100% sean de grado 1, o viceversa, obteniendo un bajo porcentaje de formación de callos pero la mayoría sean de grado 3.

Los mejores resultados obtenidos en cuanto al desarrollo de callos corresponden al uso del medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$ . En la Figura 18 se observan las diferencias obtenidas para los mejores cuatro tratamientos de grado de desarrollo 2 y 3.

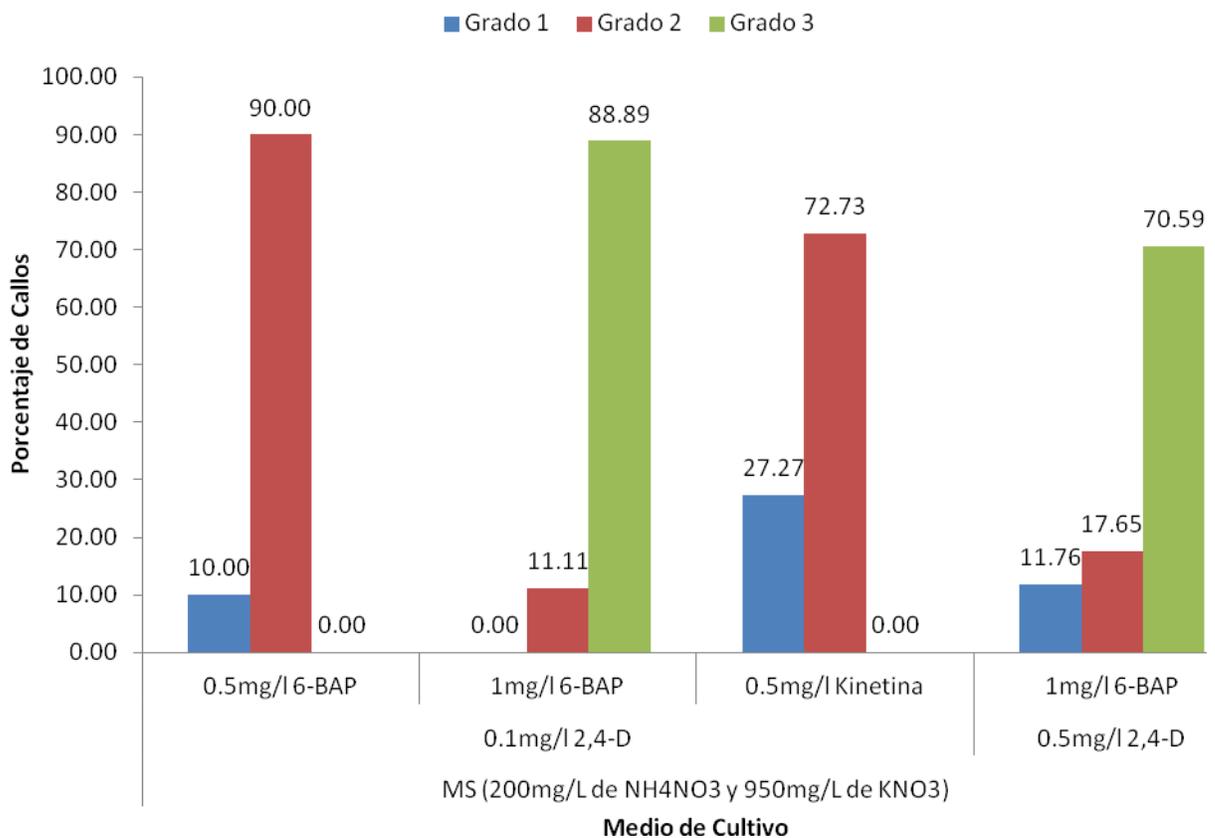


Figura 18. Porcentaje de desarrollo de callos según escala de Santana.

La composición del medio de cultivo utilizado pudo causar las diferencias encontradas en cuanto a la formación y desarrollo de los callos; según Ogawa (1999) en la composición

del medio de cultivo, el nutriente, particularmente la fuente de Nitrógeno, afecta la formación de callos en monocotiledóneas; así mismo Lee et al. (Lee, Jeon, & Kim, 2002) indicaron que la formación de callos estuvo influenciada por el genotipo, medio de cultivo y el tipo de explante y por sus interacciones. En cuanto al medio de cultivo empleado, Neumann (1995), menciona que existe una selectividad preferencial de las células por la forma amino del Nitrógeno en las sales inorgánicas MS. En estas mismas sales el amonio como forma reducida de Nitrógeno es fácilmente utilizado para la síntesis de aminoácidos y permite el crecimiento de un callo friable (disgregable) (Bautista, Peñalver, Rodríguez, Camacho, & Peralta, 2008).

Otro factor importante es la interacción existente entre el medio de cultivo utilizado y las diferentes concentraciones de 2,4-D; en este caso los mayores valores en la inducción de callos se obtuvieron utilizando una concentración de 0.1 mg/l, además de la interacción existente entre auxinas y citocininas ya que los mejores porcentajes se obtuvieron utilizando BAP como regulador de crecimiento.

Según Medina (2011) la forma más usual para obtener callos in Vitro es exponiendo a un explante a altas concentraciones de auxinas; en esta evaluación, esta teoría no es aplicable, debido a que generalmente se obtuvieron mejores resultados utilizando 0.1 mg/l de 2,4-D comparado con el uso de 0.5 mg/l. Según Peñalver (2008) el mayor porcentaje de inducción de callos en *Anturio* var. *Lambada* se obtuvo utilizando 1.5 mg/l de 2,4-D, Pierik (1976) logró la inducción de callos utilizando 0.08 mg/l de 2,4-D, Warner (1993) obtuvo mayor porcentaje de inducción de callos en peciolo de *Anthurium cubense* utilizando una concentración de 0.5 mg/l de 2,4-D; esto revela que el medio de cultivo y la reacción de los explantes difiere para cada variedad vegetal evaluada.

No es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular. Un ejemplo de ello es el protocolo empleado por Stamp y Meredith en diferentes cultivares de *Vitis vinifera*. En cuatro de ellos fue posible la obtención de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos, pero estos resultados no se repitieron con el cultivar "Pinot Noir" (García Olmedo & Et.Al, 2010).

Otro aspecto que se pudo observar fue la consistencia de los callos, los cuales generalmente presentaban una consistencia compacta, se obtuvieron callos friables en un bajo porcentaje (21%) para el total de los tratamientos; los callos compactos no presentaban disgregación al momento de realizar algún corte o al momento de tomarlos con las pinzas, a diferencia de los callos friables que se disgregaban fácilmente (Figura 19).



Figura 19. Callos friables (1), callos compactos (2).

### 2.7.2 Fase II: formación de brotes

Durante el desarrollo de la fase II, los callos ya permanecían bajo condiciones de luz y ya se iniciaba la formación de clorofila y pequeños brotes, los cuales al transcurrir el tiempo empezaban a formar sus primeras hojas verdaderas, de color verde brillante y de forma acorazonada.

Después de transcurridos 3 meses, los callos sembrados presentaban formación de brotes; todos los medios de cultivo evaluados en esta fase provocaron la formación de brotes, alcanzando un máximo del 100% en el medio MS suplementado con 0.05 mg/l de IBA más 3 mg/l de BAP, seguido por un 96.77% con el medio MS suplementado con 0.05 mg/l de IBA más 0.6 mg/l de BAP. En la Figura 20 puede observarse el porcentaje de formación de brotes para cada uno de los medios de cultivo evaluados.

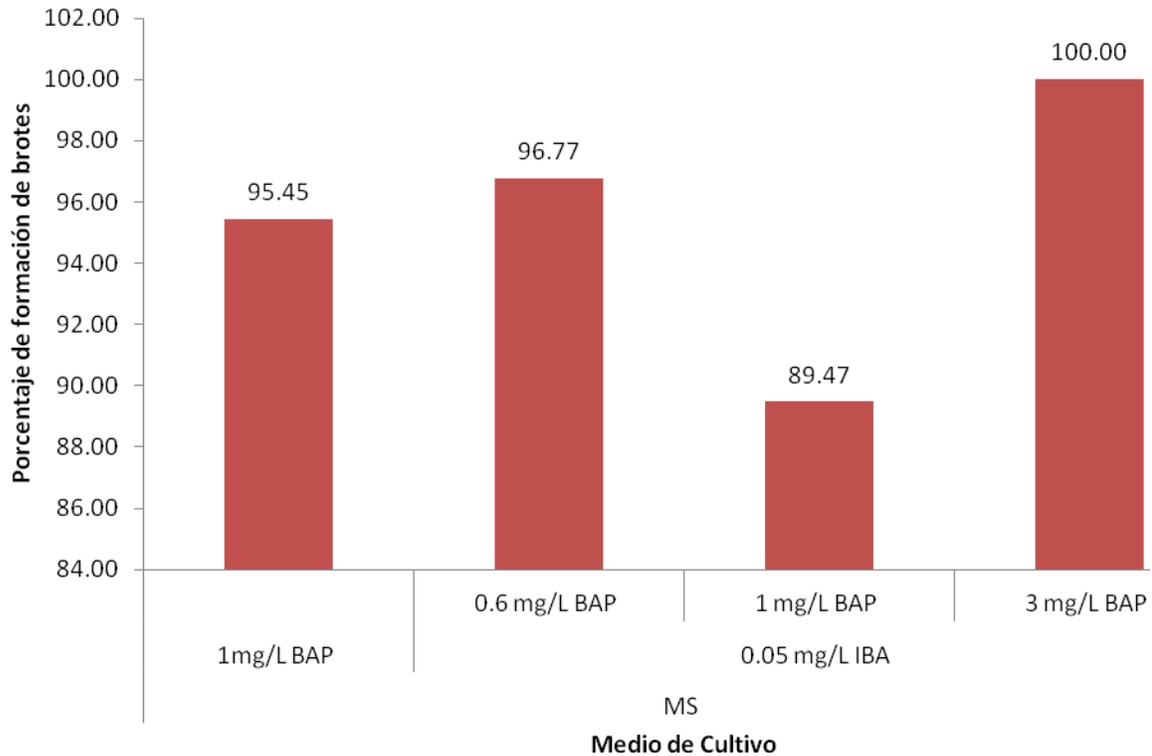


Figura 20. Formación de brotes para cada medio de cultivo evaluado.

Es importante señalar que los callos que no presentaban formación de brotes generalmente eran de consistencia friable, los callos compactos obtenidos en su totalidad mostraban formación de brotes.

Los brotes obtenidos en cada medio de cultivo presentaban pequeñas diferencias cualitativas, las cuales se describen:

- El medio de cultivo MS más 1 mg/l de BAP dio origen a brotes pequeños, los callos presentaban una alta población de brotes, por lo que eran delgados, poco desarrollados y de coloración verde pálido, además de existir un alto porcentaje de brotes albinos y muertos (imagen 1 de Figura 21).
- Los brotes obtenidos en el medio de cultivo MS suplementado con 0.05 mg/l de IBA más 0.6 mg/l de BAP eran medianos, con un alto porcentaje de brotes grandes, respecto a los demás tratamientos; bien formados, delgados, desarrollados,

poseían una apariencia vigorosa y una coloración verde oscuro brillante (imagen 2 de Figura 21).

- Al utilizar el medio de cultivo MS suplementado con 0.05 mg/l de IBA más 1 mg/l de BAP, se obtuvieron brotes medianos, bien formados, con tallos gruesos y de coloración verde oscuro brillante, algunos de los callos presentaban alta población de brotes pequeños (imagen 3 de Figura 21).
- Por último los brotes obtenidos en el medio de cultivo MS suplementado con 0.05 mg/l de IBA más 3 mg/l de BAP eran medianos, bien formados, de coloración verde oscuro, con apariencia robusta y alta población de brotes pequeños no desarrollados (imagen 4 de Figura 21).

En la Figura 21 se muestran cuatro diferentes imágenes correspondientes a los brotes obtenidos en cada medio de cultivo.



Figura 21. Brotes obtenidos en la fase II en cada medio de cultivo evaluado.

El mayor promedio de brotes obtenidos por callo fue de 78, obtenidos al utilizar el medio MS más 1 mg/l de BAP, seguido por 41 con el medio MS con 0.05 mg/l de IBA más 3 mg/l de BAP, luego por 38 con el medio MS con 0.05 mg/l de IBA más 1 mg/l de BAP y por

último 26 con el medio MS con 0.05 mg/l de IBA más 0.6 mg/l de BAP. En la Figura 22 puede observarse el promedio de brotes obtenidos por callo.

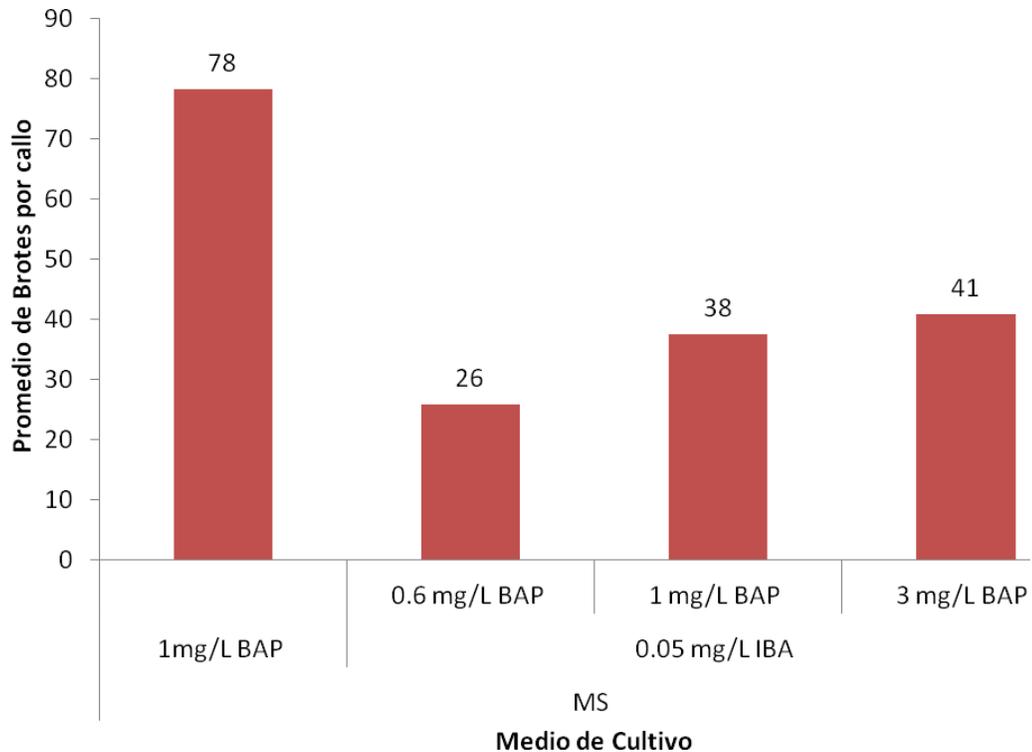


Figura 22. Número promedio de brotes por callo para cada medio de cultivo.

En cuanto a la clasificación de brotes según su tamaño, el mejor porcentaje para la categoría A se obtuvo en el medio MS con 0.05 mg/l de IBA más 1 mg/l de BAP con un 64.32%, para la categoría B en el medio MS más 1 mg/l de BAP con un 46.30% y para la categoría C en el medio MS con 0.05 mg/l de IBA más 0.6 mg/l de BAP con un 10.31%. En la Figura 23 se muestra la clasificación de brotes en cuanto a su tamaño para cada medio de cultivo evaluado.

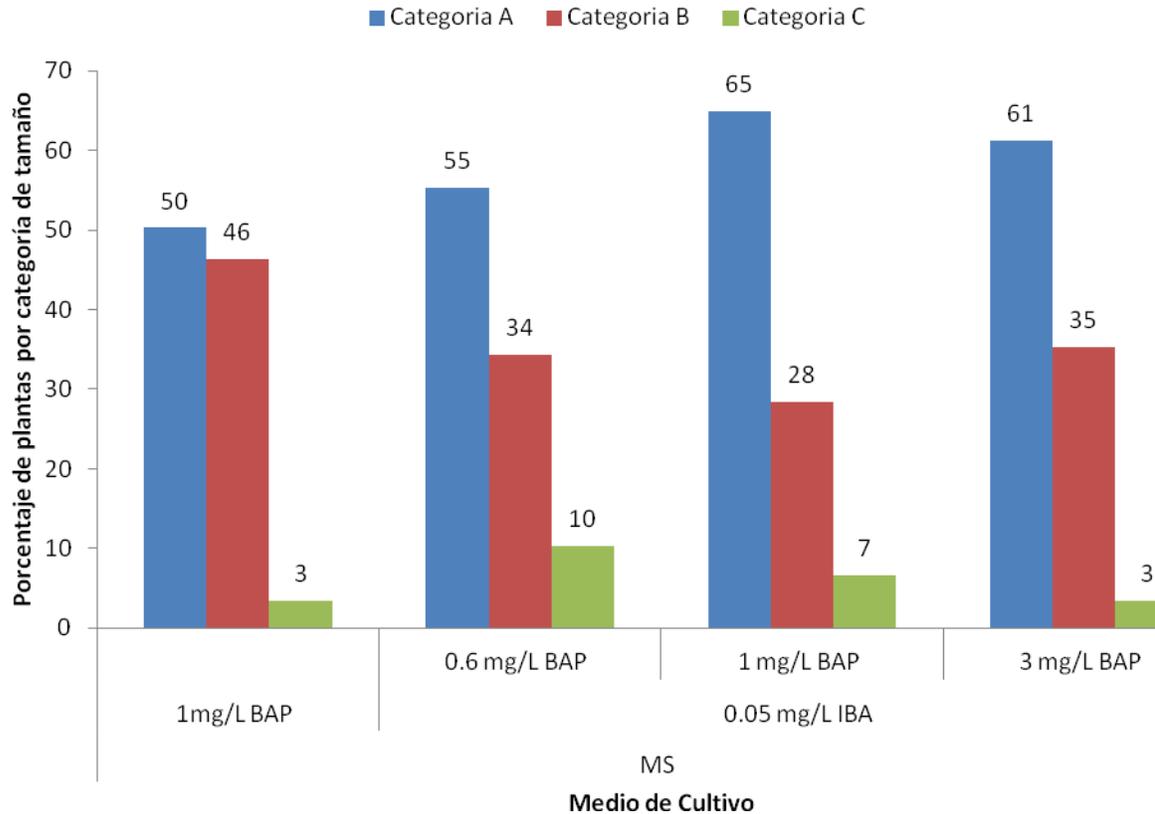


Figura 23. Clasificación de tamaño de brotes para cada uno de los medios de cultivo evaluados.

Como observa en los resultados planteados, en los cuatro medios de cultivo evaluados se obtuvo la formación de brotes, debido a que en todos los medios se utilizó como regulador de crecimiento BAP, citocinina que provee la división celular, la organización de callos, diferenciación de yemas y brotes adventicios en callos y órganos.

En cuanto a los medios de cultivo suplementados con 0.05 mg/l de IBA, se logró la formación de brotes, según Skoog y Miller, la interacción auxina–citocinina provoca la formación de brotes inducidos previsiblemente de callos de tabaco usándose relativamente bajos niveles de auxina y altos niveles de citocinina en el medio de propagación.

Skoog et al, (1957), demostró la importancia de las proporciones de auxina:citocinina en la determinación de la respuesta morfogénica in Vitro. Una proporción alta de auxina comparada con la de citocinina favorecía la formación de raíces, mientras una proporción baja favorecía la formación de yemas (Roca & Mroginski, 1991).

El uso de 0.05 mg/l de IBA combinado con 0.6 mg/l de BAP presentó los mejores resultados en cuanto a las variables respuestas, debido a que obtuvo un alto porcentaje en la formación de brotes (96.77%), y a pesar de que el promedio/planta fue bajo, los brotes eran bien desarrollados y con apariencia vigorosa, respecto a los demás tratamientos; además obtuvo el mayor porcentaje de brotes mayores a 10 cm. En general, los brotes obtenidos en los medios de cultivo que contenían IBA eran cualitativamente de mejor calidad que las obtenidas en el medio de cultivo sin IBA, debido a que las brotes eran más vigorosos, más gruesos y robustos.

La obtención de brotes se logró a través de la formación de callos y posteriormente la organogénesis; debido a que durante la investigación no fue posible identificar la presencia de embriones somáticos que dieran lugar a una embriogénesis somática; mas sin embargo este proceso obtenido llevará a la producción de plantas completas.

## 2.8 CONCLUSIONES

1. La inducción de callos en porciones de hojas de *Anthurium andreanum* variedad White Bauty es posible mediante el uso del medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$ , suplementado con 0.1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP.
2. El mayor desarrollo de callos inducidos de *Anthurium andreanum* variedad White Bauty se logra utilizando el medio de cultivo compuesto por el medio basal MS con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$ , suplementado con 0.1 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de BAP.
3. La inducción de brotes en callos de *Anthurium andreanum* variedad White Bauty, se obtiene al utilizar el medio MS suplementado con 0.05 mg/l de IBA más 3 mg/l de BAP.

## 2.9 RECOMENDACIONES

1. Es importante considerar el estado de madurez de las hojas, debido a que el estado muy joven o adulto, puede presentar cambios en los resultados esperados en cuanto a la formación de callos.
2. Cabe resaltar que esta metodología utilizada y los resultados obtenidos pueden ser no funcionales para otras variedades de Anturio.
3. Al momento de la siembra, es importante considerar que el explante no quede totalmente sumergido en el medio de cultivo, ya que según observaciones realizadas, estos presentaban mayor incidencia de muerte.
4. Para la inducción de callos se recomienda el uso de 2,4-D combinado con una citocinina, en este caso el uso de BAP produjo mejores resultados.
5. Después de transcurridas las 18 semanas en fase I, los explantes deben exponerse a la luz, es recomendable no hacer este cambio repentinamente, debido a que los explantes pueden sufrir un shock por los cambios bruscos de luminosidad.
6. Para la regeneración de brotes se recomienda el uso de bajas concentraciones de auxinas combinado con citocininas.

## 2.10 BIBLIOGRAFIA

1. Abdelnour-Esquivel, A; Escalant, JV. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Costa Rica, IICA / CATIE. 38 p.
2. Agramonte Peñalver, D; Barbón Rodríguez, R; Jiménez Terry, F; Pérez Peralta, M; Gutiérrez Martínez, O; Collado López, R; Cárdenas, M. 2007. Embiogénesis somática en *Anthurium andreanum* Lind. variedad Lambada en medio de cultivo semisolido (en línea). Cuba. Consultado 1 jul. 2013. Disponible en <http://www.forum.villaclara.cu/index.php/component/phocadownload/category/1-forumponencias?download=15:embriogenesisissomatica>.
3. Anthura BV, NL. 1998. Cultivation guide *Anthurium*; origen and variates (en línea). Holland. 140 p. Consultado 1 jul. 2013. Disponible en <http://www.anthura.nl/page/es/home>.

4. Calva, G; Vargas, JP. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro (en línea). Revista Digital Universitaria 6(11). Consultado 1 jul. 2013. Disponible en [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov\\_art104a.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf)
5. García Olmedo, F. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. G Levitus; V Echenique; C Rubinstein; E Hopp; L Mroginski eds. Argentina, INTA. 650 p.
6. Garibay, G; Ramírez, Q; Munguía, L. 2004. Biotecnología alimentaria. México, Limusa / Grupo Noriega Editores. 636 p.
7. Gisbert Doménech, C. 2011. Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica (en línea). España. Consultado 10 jul. 2013. Disponible en <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20-%20art%C3%ADculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf?sequence=1>
8. Lee, K; Jeon, H; Kim, M. 2002. Optimization of a mature embryo-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71:237-244.
9. Morales Chiroy, HR. 2002. Inducción de callo y regeneración *in vitro* de plantas a partir de segmentos de hoja de anturio (*Anthurium* sp.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, FAUSAC. 58 p.
10. Ovando Medina, I. 2011. Manual de cultivo de tejidos vegetales para ingenieros biotecnólogos (en línea). Argentina. Consultado 25 jul. 2013. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Manual%20c%20in%20v.pdf>
11. Rivero-Bautista, N del; Agramonte, D; Barbón, R; Camacho, W; Collado, R; Jiménez, F; Pérez, M; Gutierrez, O. 2006. Inducción y formación de callos de *Anthurium andraeanum* variedad "Lambada" a partir de secciones foliares de plantas *in vitro*. Villa Clara, Cuba. Biotecnología Vegetal 6(1):35-40.
12. Rivero-Bautista, N del; Agramonte-Peñalver, D; Barbón-Rodríguez, R; Camacho-Chiu, W; Collado-López, R; Jiménez-Terry, F; Pérez-Peralta, M; Gutiérrez-Martínez, O. 2008. Embriogénesis somática indirecta en anturio (*A. andraeanum*) var. Lambada. Villa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Ra Ximhai 4(1):135-149.
13. Roca, WM; Mroginski, LA. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 969 p.
14. Salgado Mejía, JM. 2007. Cultivo *in vitro* de *Anthurium andraeanum* -monografía-. Colombia, Grupo de Investigación de Biotecnología de Productos Naturales. 91 p.

15. Trujillo Sánchez, R; Concepción Laffitte, O; Daquinta Gradaille, M; Nápoles Borrero, L; Balmaseda Avila, M. 2000. Propagacion *in vitro* de *Anthurium andraeanum* Lind. variedad 'Sonate'. *Biotecnología Vegetal* 2000 1:33-38.
16. Warner, J; Herrera, J; Guevara, E. 1993. Morfogénesis *in vitro* de *Anthurium cubense* (Araceae). *Biología Tropical* 41(3):455-460.

## 2.11 ANEXOS

Cuadro 12A. Medio MS modificado con los macroelementos reducidos al 50%

<b>MACROELEMENTOS</b>	<b>mg/l</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	825
<b>KNO<sub>3</sub></b>	950
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	220
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	185
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	85
<b>MICROELEMENTOS</b>	
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	22.3
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8.6
<b>KI</b>	0.83
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.25
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.025
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0.025
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	27.85
<b>Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O</b>	37.25
<b>ORGANICOS</b>	
<b>Glicina</b>	2
<b>Ácido Nicotínico</b>	0.5
<b>Pyridoxina.HCl</b>	0.5
<b>Thiamina.HCl</b>	0.1
<b>Myo-Inositol</b>	100
<b>Sacarosa</b>	30 gr/L
<b>pH</b>	5.7-5.8

Cuadro 13A. Medio MS modificado con 200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 950 mg/l de  $\text{KNO}_3$ 

<b>MACROELEMENTOS</b>	<b>mg/l</b>
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	200
$\text{KNO}_3$	950
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
<b>MICROELEMENTOS</b>	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25
<b>ORGANICOS</b>	
Glicina	2
Ácido Nicotínico	0.5
Pyridoxina.HCl	0.5
Thiamina.HCl	0.1
Myo-Inositol	100
Sacarosa	30 gr/L
pH	5.7-5.8

**CAPITULO III. SERVICIOS REALIZADOS EN LA BIOFÁBRICA DEL DEPARTAMENTO  
DE BIOTECNOLOGÍA DEL INGENIO MAGDALENA, S.A., LA DEMOCRACIA,  
ESCUINTLA.**

### 3.1 PRESENTACIÓN

La caña de azúcar es un cultivo de las zonas tropicales y su explotación ha constituido una de las principales actividades económicas de Guatemala, debido a la diversidad de productos finales que de ella se derivan.

En Guatemala, CENGICANÑA, ha desarrollado programas para aumentar el rendimiento de caña de azúcar, sin embargo, la obtención de materiales con resistencia genética a enfermedades es muy importante para alcanzar indirectamente el incremento en el rendimiento de azúcar. La obtención de variedades resistentes implica el desarrollo y aplicación de métodos adecuados de selección y diagnóstico para las principales enfermedades que afectan al cultivo. Además, algunas de estas enfermedades son sistémicas y requieren ser eliminadas eficientemente en el establecimiento de semilleros, pues la reproducción de la caña de azúcar se realiza a través de semilla vegetativa (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012).

Sin embargo, existe la técnica de propagación in vitro a través de la obtención de meristemas y uso de termoterapia para la eliminación de patógenos, dicha técnica ha resultado ser muy eficiente en cuanto a la obtención de materiales libres de patógenos y la multiplicación masiva de plantas con características deseables.

Dentro de los servicios prestados en la biofábrica, se realizaron dos investigaciones, una enfocada a la evaluación de concentraciones de Calcio para estimular el enraizamiento de brotes de caña de azúcar, fue posible determinar que el Calcio actúa como regulador de crecimiento, estimulando tanto el desarrollo de raíces y nuevos brotes. Además se evaluó el efecto de tres diferentes métodos de desinfección para la eliminación de contaminación a nivel de laboratorio en brotes meristemáticos “toletes” de caña de azúcar para la posterior extracción de meristemas, dentro del cual se determinó que el método de desinfección utilizado actualmente puede ser sustituido por el método 2 obteniendo el mayor porcentaje de meristemas libres de contaminación; por lo que también se plantean varias recomendaciones para la mejora de los resultados y así disminuir la contaminación en la extracción de meristemas, garantizando la obtención de plantas libres de patógenos.

## 3.2 MARCO CONCEPTUAL

### 3.2.1 Generalidades del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*)

#### 3.2.1.1 Clasificación taxonómica

La caña de azúcar se ubica en la siguiente clasificación botánica (FAO):

REINO: Vegetal  
 TIPO: Fanerógamas  
 SUBTIPO: Angiospermas  
 CLASE: Monocotiledóneas  
 ORDEN: Glumales  
 FAMILIA: Gramineae  
 TRIBU: Andropogoneas  
 GÉNERO: *Saccharum*  
 ESPECIES: *Spontaneum* y *robustum* (silvestres), *edule*, *barberi*, *sinense* y *officinarum* (domesticadas)

La *S. officinarum* corresponde a las cañas cultivadas hoy en día y se considera que fue domesticada a partir de *S. robustum*. Cada una de las especies mencionadas tiene sus propias características que la identifican de manera específica. El número de cromosomas es variable dentro de cada especie, lo cual ha incidido en una variación genética amplia en sus progenies, cuando ellas han sido utilizadas en cruces entre las especies (FAO).

Los clones comerciales de caña de azúcar son derivados de las combinaciones entre las seis especies anteriores (FAO).

#### 3.2.1.2 Características botánicas

El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA 1994), describe la morfología de la caña de azúcar de la siguiente forma:

El sistema radicular se presenta de dos formas, los primordios radiculares que tienen un período de vida de 30 a 40 días, y las raíces permanentes, que brotan de los tallos o macollos, que se forman a partir de los esquejes.

El tallo es la parte aprovechable donde se almacena la sacarosa, se presenta un número de tallos de 10 a 18 por metro lineal, lo cual da una población de 60 a 70 mil tallos por

hectárea. Flores (1976) indica que el tallo está formado por una serie de nudos separados por los entrenudos donde se localizan las yemas.

Las hojas se originan de cada nudo y esta distribuidas en forma alterna en el tallo, la hoja está formada por la lámina foliar y por la vaina, ambas unidas por el cuello en el cual se ubica la lígula. Cuando la vaina tiene buen deshoje se facilita la cosecha de la caña y se lleva menos impurezas en la caña (CENGICAÑA 1994).

La inflorescencia es una panícula espigada sedosa, constituida por un eje principal donde se insertan las espiguillas, dispuestas por pares en cada articulación, donde se encuentra la flor, la cual es hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas (CENGICAÑA 1994).

### **3.2.1.3 Propagación**

#### **A. Método convencional**

El método convencional para la propagación de la caña de azúcar es a través del uso de esquejes de tallo.

Los esquejes de los tallos constituyen en material que se utiliza para la reproducción del cultivo de la caña y es lo que se denomina semilla. Para asegurar el establecimiento de una buena plantación comercial debe partirse de la confección del semillero, este debe considerarse una etapa especial en el programa operacional de la siembra, porque permite obtener material de buena calidad, facilita una rápida germinación, buen vigor y macollamiento, una mayor homogeneidad en la plantación; una mayor vida del cañal y altas posibilidades de tener una plantación con elevada capacidad productiva (Subirós Ruiz, 2000).

#### **B. Cultivo de tejidos**

El cultivo de tejidos es otro método disponible para la obtención de subclones, lo que permite el desarrollo de nuevos materiales genéticos, dejando de lado los problemas relacionados con el cruzamiento sexual, además de permitir la obtención de plantas

sanas, libres de enfermedades como la roya, el virus del mosaico y el raquitismo del retoño (Subirós Ruiz, 2000).

Estos desarrollos biotecnológicos permiten a los patólogos disponer de una serie de ventajas al aplicar este método, tales como:

- Aumentar las oportunidades para obtener variedades resistentes a las enfermedades.
- Seleccionar clones resistentes a enfermedades y mutantes con buenas características agronómicas.
- Realizar cultivo de meristemas y procedimientos inmunológicos para obtener materiales vegetales libres de patógenos como medida de cuarentena.

También se han realizado estudios para obtener callos, regenerando plantas de caña a partir de cultivos de protoplastos, así como para seleccionar líneas de plantas resistentes a antimetabolitos; esto significa la obtención de variedades resistentes a ciertos productos químicos como herbicidas y otras sustancias.

#### **3.2.1.4 Zona cañera en Guatemala**

Según la caracterización de la zona cañera en Guatemala, realizado por el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA) La Agroindustria Azucarera de Guatemala está conformada por 13 ingenios azucareros, los cuales se encuentran distribuidos geográficamente de la siguiente manera (Villatoro & Pérez, 2014):

- Diez de ellos se ubican en la planicie costera del océano Pacífico o costa sur de Guatemala y ocupan casi la totalidad del área sembrada con caña (99%). Estos ingenios son: Tululá, Palo Gordo, Madre Tierra, La Unión, Pantaleón, Concepción, Magdalena, Santa Ana, Trinidad y El Pilar.
- Los otros tres ingenios se localizan en diferentes lugares de la república y ocupa áreas relativamente pequeñas. En el municipio de Villa Canales del departamento de Guatemala se encuentra el ingenio Santa Teresa, y en el departamento de

Santa Rosa se encuentra el ingenio La Sonrisa. El ingenio Chabil Utzaj que está en fase de establecimiento se localiza en la parte norte del país, en el departamento de Alta Verapaz.

### **3.2.2 El Calcio en las plantas**

El calcio es un elemento muy importante y esencial para la formación y desarrollo inicial de todos los órganos y tejidos de las plantas, ya que es indispensable para la formación de cada una de las células y su multiplicación, se requiere para la conformación de las paredes celulares y para la regulación de la integridad de las membranas, de forma tal que su carencia genera fuertes malformaciones, necrosis de hojas, aborto de flores, muerte de los puntos meristemáticos de algunos cultivos (Yáñez Reyes, 2002).

Según Sam E. Feagley y Lloyd B. Fenn, durante su investigación sobre el uso de Calcio soluble para estimular el crecimiento vegetal, fundamentan que el Calcio aumenta la absorción de amonio, Potasio y Fósforo, estimula la fotosíntesis y aumenta el tamaño de las partes comerciables de la planta (Fenn, s.f.).

#### **3.2.2.1 El Calcio (Ca) como un regulador**

Existen estudios que hacen claro que la concentración de Calcio tanto en células vegetales como animales es baja, y que las plantas son capaces de responder a diversos estímulos provocados por cambios en las concentraciones de Calcio. Por esta razón los biólogos no necesitan mayores datos para sugerir que el Calcio es un traductor potencial de señales dentro de la planta. A mediados de los años 70's muchos científicos trabajaron en diferentes aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas con lo que venían a reconocer la importancia potencial del Calcio como agente de señalización intracelular. Aunque fueron varias las inferencias que se realizaron en cuanto a la función del Calcio dentro de la planta, a continuación se describen las que vienen siendo las más importantes.

### A. El calcio y la división celular

Rasmussen (1970), fue enormemente estimulado y logro proporcionar a través de un amplio recorrido, sobre un papel del Calcio en diversos procesos de transducción de señales, quizás especialmente incluyendo una relación entre Calcio y el citoesqueleto. Pero el momento que define verdaderamente las funciones del Calcio relacionadas a la división celular, ocurrió con la publicación por Weisenberg (1972), que mostró que una baja concentración de Calcio (1,0 mM) fue necesario para alcanzar microtúbulos de polimerización in vitro. Otros estudios con EDTA y especialmente EGTA, establecieron claramente que era Calcio y no Mg el responsable de la despolimerización de microtúbulos (Weisenberg 1972).

En la Figura 24 se representa un sistema de Calcio que contiene el retículo endoplasmático que se extiende desde los polos del huso de los cromosomas a lo largo de los microtúbulos del cinetocoro. Se sugirió que durante la etapa de anafase, se libera Calcio desde el retículo endoplásmico lo que activa procesos móviles (por ejemplo, la despolimerización de microtúbulos) y por lo tanto facilita el movimiento de los cromosomas a los polos del huso. En apoyo de este modelo, se ha observado que el Calcio ha estimulado la despolimerización de los microtúbulos y la facilitación del movimiento cromosoma (Zhang et al., 1992). Aunque se ha reportado mediante el indicador de absorbancia Arsenazo III (Hepler y Callaham, 1987), que existe un aumento endógeno en la concentración de Calcio durante la anafase, esto no se ha repetido con un colorante fluorescente más eficaz.

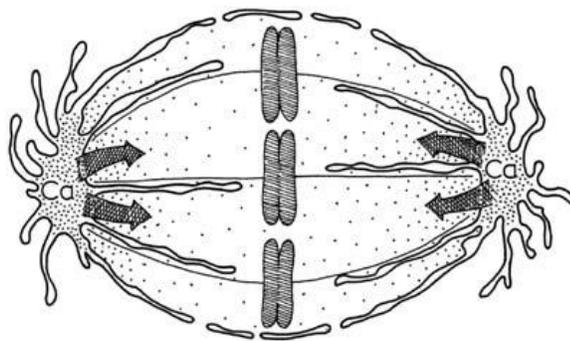


Figura 24. Movimiento del Calcio en el retículo endoplasmático (Hepler et al., 1981)

### 3.2.2.2 El Calcio y los reguladores de crecimiento

Además de una posible interacción entre ácido giberélico y Calcio, las conexiones entre este ión y otros reguladores del crecimiento de las plantas estaban surgiendo mediados de los años 70's. Así, se observó que el Calcio ayuda a mejorar la capacidad de la citoquinina para retardar la senescencia (Poovaiah y Leopold, 1973b) y abscisión de la hoja (Poovaiah y Leopold, 1973a) y para promover la expansión de los cotiledones (Leopold et al., 1974). El Calcio también fue encontrado para inhibir la estimulación de citoquinina de antocianina (Elliott, 1977) y la síntesis de betacianina (Elliott, 1979).

Sin embargo, otros estudios identifican una conexión entre Calcio /citoquinina/ etileno, y aunque hubo desacuerdo entre publicados informes sobre la naturaleza de la interacción, Lau y Yang (1975), en estudios realizados en segmentos de hipocótilo de frijol, informaron de que la captación de kinetina fue estimulada en gran medida por la acción del Calcio, además el Calcio estimuló la captación y el metabolismo de kinetina. Cabe destacar que tanto Calcio y kinetina provocaron un aumento notable en el etileno (Lau y Yang, 1975). Por el contrario, Poovaiah y Leopold (1973a), en los estudios de abscisión foliar en explantes de peciolo de frijol, encontró que Calcio inhibe la producción de etileno. Por tanto, se postula que la citoquinina estimula la disponibilidad y absorción de Calcio, promoviendo así el metabolismo (LeJohn et al., 1973).

Aunque una idea temprana sobre una interacción Calcio /auxina ya ha sido discutido y menospreciado, especialmente en la medida en que estos agentes afectan a la estructura y expansión de la pared, sin embargo, hubo procesos fisiológicos que sugieren una posible coordinación en su actividad. Por ejemplo, transporte de auxina se redujo por una baja en la concentración de Calcio (EDTA) (De la Fuente y Leopold, 1973), mientras que la inducción de auxinas por la secreción de protones fue estimulada por el Calcio (Rubinstein et al., 1977).

La omnipresencia del Calcio, actividad dirigida por Leopold (1977) lo impulsó a abrir un artículo resumen con la siguiente afirmación "Acciones de cada una de las hormonas del crecimiento de plantas pueden ser alteradas por sales de calcio...".

Además, según Burström, 1968; Hepler y Wayne, 1985, el calcio está involucrado en la división y elongación celular, por lo que es muy importante en el desarrollo de las raíces.

### **3.2.3 Multiplicación *in vitro* de meristemas de caña de azúcar**

El cultivo de meristemas es la técnica más utilizada para el saneamiento de plantas infectadas, se basa en el supuesto de que no todas las células de un meristemo apical están infectadas con el patógeno, pues no llegan los haces vasculares y que por lo tanto es posible disectar una región no infectada y regenerar una planta sana (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012).

Este sistema permite, además de la destrucción por termoterapia de los patógenos, una rápida multiplicación del material. El desarrollo de una metodología para el cultivo de caña de azúcar *in vitro*, surgió como respuesta a la necesidad de erradicar enfermedades de tipo sistémico, y para mantener y multiplicar materiales de escasa disponibilidad (Victoria & Calderón, 1995).

El proceso de multiplicación *in vitro* exige unos manejos adecuados de los tallos, que una vez cortados, se lavan con jabón y se sumergen en agua caliente a 50 °C durante 1 hora; posteriormente se cortan en trozos con una yema y se siembran en vasos con suelo estéril. Después de la emergencia, las plantas se mantienen aproximadamente 20 días en una cámara de termoterapia a una temperatura constante de 41 ° C y un fotoperiodo de 12 horas (Gómez y Piza 1992; Moreno 1991). Los tallos de las plantas, una vez que se tratan con termoterapia, se cortan en trozos de 7 a 10 cm; se lavan con jabón y agua corriente; luego se escurren y se sumergen, primero, en alcohol al 96% durante 10 segundos y, después, en hipoclorito de calcio al 4% durante 15 minutos. Para recolectar las yemas, los tallos se secan con un papel filtro estéril; y en un estereoscopio con la ayuda de una pinza, un punzón y un bisturí estéril, se hace la disección y extracción del meristemo, que mide entre 1 y 2 mm y contiene dos primordios foliares. El meristemo se establece y desarrolla en un medio de cultivo MS de etapa inicial durante 10 días en la oscuridad y 5 días en la luz (Moreno y Victoria 1991).

En CENGICAÑA, los segmentos de tallo con una yema son tratados con agua caliente a 51 °C durante 1 hora, luego son colocadas en una bandeja plástica con papel absorbente humedecido, a temperatura ambiente y oscuridad durante 10 días, para favorecer la brotación de las yemas (Figura 25).



Figura 25. Brotación de yemas para la obtención de meristemas (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012).

Posteriormente realizan una desinfección superficial con una solución de hipoclorito de sodio al 2 por ciento v/v durante 20 minutos y luego son lavados tres veces con agua esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente se extraen los meristemas apicales con un diámetro aproximado de 0.2 – 0.5 mm a partir de los brotes desinfectados (Figura 26) y son inoculados en un medio MS, los meristemas son incubados a 25 °C durante ocho días bajo condiciones de oscuridad con el objetivo de disminuir el daño causado por oxidación y posteriormente son trasladados a condiciones de luz con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y la misma temperatura (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012).



Figura 26. Detalle del meristemo apical utilizado como explante (Aumento 15X) (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012)

De acuerdo con lo anterior, a partir de un tejido meristemático único cultivado in vitro, se pueden obtener 1600 plantas en 3 meses (Victoria & Calderón, 1995).

### 3.3 MARCO REFERENCIAL

#### 3.3.1 Lugar y condiciones del lugar

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Ingenio Magdalena (BIOMAG), ubicado en la finca San Patricio km 99.5 carretera a Sipacate, La Democracia, Escuintla (Ver Capítulo I).

La investigación se llevó a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio, dentro del cual se manejan dos salas de desarrollo de plantas con diversos cultivos, dentro de los cuales es posible mencionar: Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*), Orquídeas, Gusnay (*Spathiphyllum sp.*), Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*); cada sala de desarrollo de plantas posee iluminación artificial controlada (3,000 lux por 16 horas luz), y temperatura de  $25\pm 2$  °C.

### **3.4 EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CONCENTRACIONES DE CALCIO EN LA EMISIÓN DE RAÍCES PARA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*).**

#### **3.4.1 Objetivos**

##### **3.4.1.1 General**

Evaluar dos diferentes medios de cultivo y seis diferentes concentraciones de Calcio para la inducción de raíces en caña de azúcar (*Saccharum spp.*), en el área de Biotecnología de la finca San Patricio.

##### **3.4.1.2 Específicos:**

- a. Determinar el medio de cultivo que presente una mayor emisión de raíces en plantas de caña de azúcar.
- b. Determinar la combinación de medio de cultivo y Calcio que induzca el mayor porcentaje en formación de raíces en caña de azúcar.
- c. Demostrar que el Calcio puede ser utilizado como regulador de crecimiento para la inducción y formación de brotes y raíces en caña de azúcar.
- d. Identificar un sustituto del medio de enraizamiento actualmente utilizado en la biofábrica.

#### **3.4.2 Metodología**

##### **3.4.2.1 Descripción de tratamientos**

Se evaluaron 18 tratamientos, dos medios de cultivo con seis diferentes concentraciones de Calcio (12 tratamientos) y seis tratamientos con agua destilada y las diferentes concentraciones de Calcio.

Los medios de cultivo utilizados fueron el MS (Murashige & Skoog) y una modificación del medio MS, utilizado como medio de enraizamiento dentro de la biofábrica, llamado MR, el cual contiene básicamente las sales brindadas por el medio MS, enriquecido con IBA 1 mg/L y 40 gr/L de sacarosa. En el Cuadro 14 se presenta la descripción de cada uno de los tratamientos evaluados.

Cuadro 14. Descripción de tratamientos para la inducción de raíces en plantas de caña de azúcar.

<b>Tratamiento</b>	<b>Medio de cultivo<sup>1</sup></b>	<b>Concentración de Calcio (ppm)</b>
1	H <sub>2</sub> O	0
2	H <sub>2</sub> O	20
3	H <sub>2</sub> O	40
4	H <sub>2</sub> O	60
5	H <sub>2</sub> O	80
6	H <sub>2</sub> O	100
7	MS	0
8	MS	20
9	MS	40
10	MS	60
11	MS	80
12	MS	100
13	MR	0
14	MR	20
15	MR	40
16	MR	60
17	MR	80
18	MR	100

### 3.4.2.2 Elaboración, distribución y esterilización de medios de cultivo

Para la elaboración de los medios de cultivo, se utilizó la metodología que se lleva a cabo actualmente dentro del laboratorio de BIOMAG; para esto se utilizaron soluciones madre de macroelementos, microelementos y vitaminas; según lo requerido de cada medio de

<sup>1</sup> La composición de cada uno de los medios de cultivo (MS, MR) son detallados en anexos.

cultivo (detalles en anexos) y utilizando el sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ) como fuente de calcio en las concentraciones requeridas según los tratamientos.

Seguidamente el medio de cultivo se distribuyó en frascos de vidrio, agregando 25ml de medio por frasco; y posteriormente se sometieron a un proceso de esterilización en un autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120 grados centígrados y 15 libras por pulgada cuadrada de presión.

### 3.4.2.3 Siembra e incubación

Las plantas que se utilizaron para la evaluación se encontraban en medio de multiplicación, las cuales se dividieron con el fin de sembrar tres brotes definidos por frasco de medio de cultivo; este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar, utilizando pinzas y bisturís debidamente esterilizados.



Figura 27. División y siembra de brotes de caña.

Posteriormente a la siembra las plantas fueron trasladadas a la sala de desarrollo, en donde las condiciones de incubación se encontraban alrededor de 25°C de temperatura y un fotoperiodo de 16 horas.

#### **3.4.2.4 Tamaño experimental**

La evaluación estuvo conformada por 18 tratamientos y 4 repeticiones, en donde cada repetición estuvo conformada por una unidad experimental (un frasco con tres plantas); haciendo un total de 72 unidades experimentales.

#### **3.4.2.5 Variables respuestas**

- Porcentaje de inducción de raíces
- Número promedio de raíces emitidas
- Número promedio de brotes emitidos
- Tamaño promedio de brotes (cm)
- Número promedio de plantas finales
- Largo promedio de raíces
- Peso promedio de raíces (g)

#### **3.4.2.6 Toma de datos**

La estimación de las diferentes variables propuestas se realizó a partir de las 2 semanas de la siembra de explantes.

#### **3.4.2.7 Análisis de la información**

A los valores de las variables evaluadas se les aplicó un análisis descriptivo con base en porcentajes y medias obtenidas, para la posterior elaboración de cuadros y figuras, obteniendo una mejor ilustración de las respuestas obtenidas.

### **3.4.3 Resultados y discusión**

A partir de la segunda semana después de la transferencia de los brotes de caña de azúcar a los diferentes tratamientos evaluados, se empezó a notar la presencia de raíces adventicias en la mayoría de los tratamientos (Figura 28); por lo que se procedió a la toma de datos.



Figura 28. Formación de raíces adventicias en caña de azúcar

En el Cuadro 15 se muestran los datos obtenidos para cada una de las variables respuestas en cada repetición; cabe resaltar que aquellas repeticiones que estén identificadas con una “c” nos indican que la unidad experimental se encontraba en estado de contaminación y debido a las condiciones de asepsia que se tienen dentro del laboratorio, la toma de datos de dicha unidad experimental fue imposible. De igual manera aquellas repeticiones que se encuentran identificadas con una “x” nos indican pérdida de la unidad por muerte del explante.

Cuadro 15. Datos obtenidos para las variables respuestas en cada tratamiento evaluado (R=número de repeticiones)

Medio	ppm de Ca	Presencia de raíces		Número de raíces				Tamaño de raíz mas larga (cm)				Número de brotes				Tamaño de brote mas largo (cm)				Número de plantas finales				Peso de raíz (g)			
		si	no	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
H2O	0 ppm Ca	3	1	0	4	2	1	0.0	1.0	2.5	3.3	6	6	4	10	7.0	7.2	6.3	7.4	9	9	7	13	0.000	0.022	0.011	0.021
	20 ppm Ca	2	2	1	0	4	3	0.3	0.0	0.4	1.3	2	0	2	2	6.5	2.0	8.9	6.3	5	3	5	5	0.004	0.000	0.010	0.022
	40 ppm Ca	0	4	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	1	0	1	5	5.3	2.0	7.1	8.5	4	1	4	8	0.000	0.000	0.000	0.000
	60 ppm Ca	1	3	0	0	1	0	0.0	0.0	0.2	0.0	0	0	0	9	4.0	1.5	6.5	6.7	3	2	1	12	0.000	0.000	0.003	0.000
	80 ppm Ca	1	3	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	2	1.9	5.6	10.6	x	3	1	5	x	0.000	0.000	0.000	x
	100 ppm Ca	2	2	2	0	1	0	0.5	0.0	0.9	0.0	1	x	3	6	7.5	x	8.5	6.7	4	x	6	9	0.020	x	0.005	0.000
MS	0 ppm Ca	4	0	39	12	18	12	1.3	1.3	0.6	0.7	13	13	5	5	8.6	14.7	12.7	13.2	16	16	8	8	0.230	0.130	0.070	0.020
	20 ppm Ca	4	0	28	18	83	29	1.5	0.8	2.2	1.4	9	12	15	11	22.5	10.0	17.6	10.0	12	15	18	14	0.190	0.130	0.290	0.100
	40 ppm Ca	4	0	22	33	9	13	2.8	1.7	0.5	1.1	14	7	6	9	11.6	18.5	11.5	12.8	17	10	9	12	0.120	0.040	0.000	0.070
	60 ppm Ca	3	1	4	20	8	33	0.4	0.7	0.7	1.5	9	16	8	5	10.0	13.8	16.4	16.4	12	19	11	8	0.530	0.060	0.010	0.060
	80 ppm Ca	4	0	16	11	28	24	0.6	0.5	1.3	1.2	11	12	12	6	12.9	9.9	14.6	11.6	14	15	15	9	0.060	0.030	0.060	0.030
	100 ppm Ca	4	0	26	7	35	22	2.5	0.4	1.0	1.3	13	10	4	15	12.7	11.1	12.4	10.2	16	13	7	18	0.180	0.060	0.160	0.090
MR	0 ppm Ca	4	0	34	76	91	76	2.3	2.7	2.4	2.5	5	13	11	9	20.5	8.4	13.2	7.5	8	16	14	12	0.150	0.250	0.210	0.350
	20 ppm Ca	4	0	86	69	98	46	2.7	3.1	2.2	1.9	15	10	9	5	12.2	9.3	8.8	13.2	18	13	12	8	0.240	0.200	0.180	0.170
	40 ppm Ca	3	1	c	84	58	45	0.0	2.6	2.2	1.2	c	11	9	5	c	13.0	9.0	9.1	c	14	12	8	c	0.200	0.200	0.140
	60 ppm Ca	4	0	c	101	61	74	0.0	3.4	1.6	1.9	c	8	10	13	c	9.7	9.4	8.8	c	11	13	16	c	0.370	0.180	0.280
	80 ppm Ca	4	0	c	69	89	37	0.0	2.3	2.0	1.4	c	12	10	7	c	7.5	8.0	8.4	c	15	13	10	c	0.270	0.280	0.230
	100 ppm Ca	4	0	c	62	79	89	0.0	2.4	1.2	2.3	c	10	8	16	c	12.9	10.6	20.1	c	13	11	19	c	0.180	0.390	0.840

El porcentaje de inducción de raíces para cada uno de los tratamientos se determinó en base a porcentaje, los porcentajes obtenidos para cada uno de los tratamientos se observan en la Figura 29, observando los mejores resultados en la utilización del medio MS y MR con un 100% de inducción de raíces en la mayoría de las concentraciones de Calcio utilizadas.

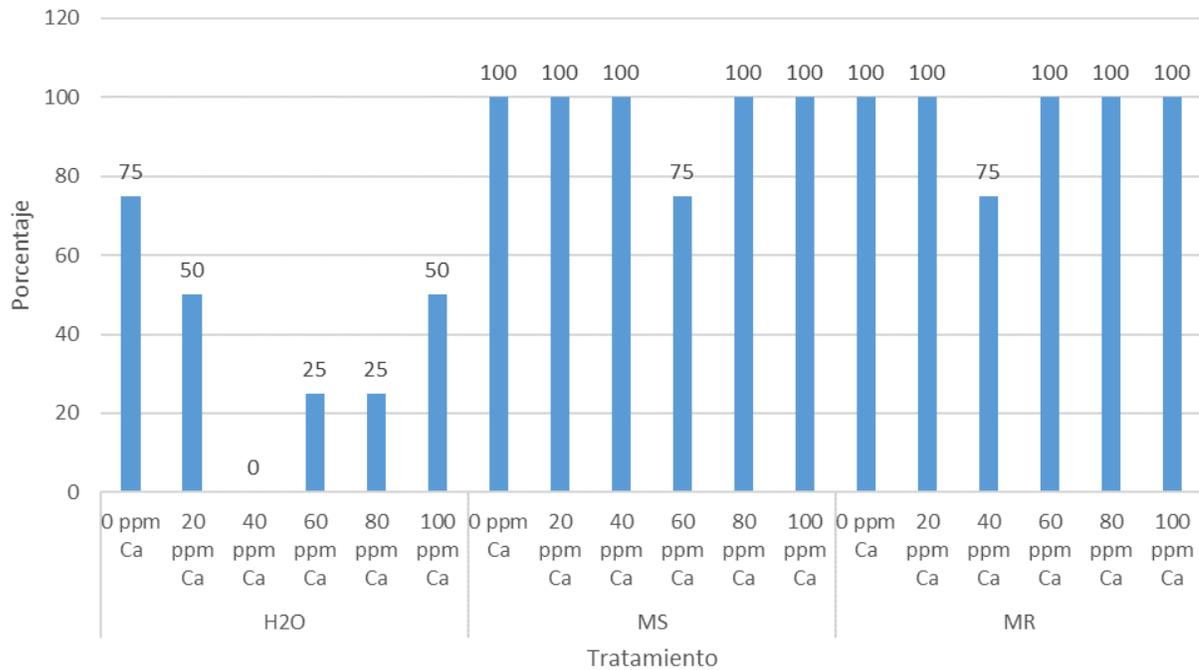


Figura 29. Porcentaje de inducción de raíces en brotes de caña de azúcar para cada uno de los tratamientos evaluados.

Aunque algunos de los tratamientos obtuvieron un 100% de inducción de raíces en sus explantes, cabe resaltar que también existieron unidades experimentales que presentaban contaminación, por lo que al obtener un explante contaminado inmediatamente es desechado dentro del laboratorio (Figura 30).

En el Cuadro 16 se muestra el número de unidades experimentales contaminadas por hongo o bacteria, observando que el mayor porcentaje de unidades experimentales contaminadas por bacteria se obtuvo en la utilización de agua destilada y Calcio, de igual manera se observó contaminación por bacteria y hongo en cuatro de los tratamientos con

medio de cultivo MR, a diferencia de los tratamientos con medio de cultivo MS, que en su totalidad estaban libres de contaminación (Figura 31).

En aquellas unidades contaminadas por bacteria, si fue posible la toma de datos, sin embargo se evitó el uso de pinzas y bisturís para evitar la contaminación de otros explantes.

Cuadro 16. Unidades experimentales contaminadas y tipo de contaminación.

Tratamiento		Contaminación	Tipo de contaminación
H <sub>2</sub> O	0 ppm Ca	1	Bacteria
	20 ppm Ca	2	Bacteria
	40 ppm Ca	3	Bacteria
	60 ppm Ca	3	Bacteria
	80 ppm Ca	4	Bacteria
	100 ppm Ca	4	Bacteria
MS	0 ppm Ca	0	Ninguna
	20 ppm Ca	0	Ninguna
	40 ppm Ca	0	Ninguna
	60 ppm Ca	0	Ninguna
	80 ppm Ca	0	Ninguna
	100 ppm Ca	0	Ninguna
MR	0 ppm Ca	0	Ninguna
	20 ppm Ca	0	Ninguna
	40 ppm Ca	1	Hongo y bacteria
	60 ppm Ca	1	Hongo y bacteria
	80 ppm Ca	1	Hongo y bacteria
	100 ppm Ca	1	Hongo y bacteria



Figura 30. Unidades experimentales contaminadas por presencia de hongo y bacterias.

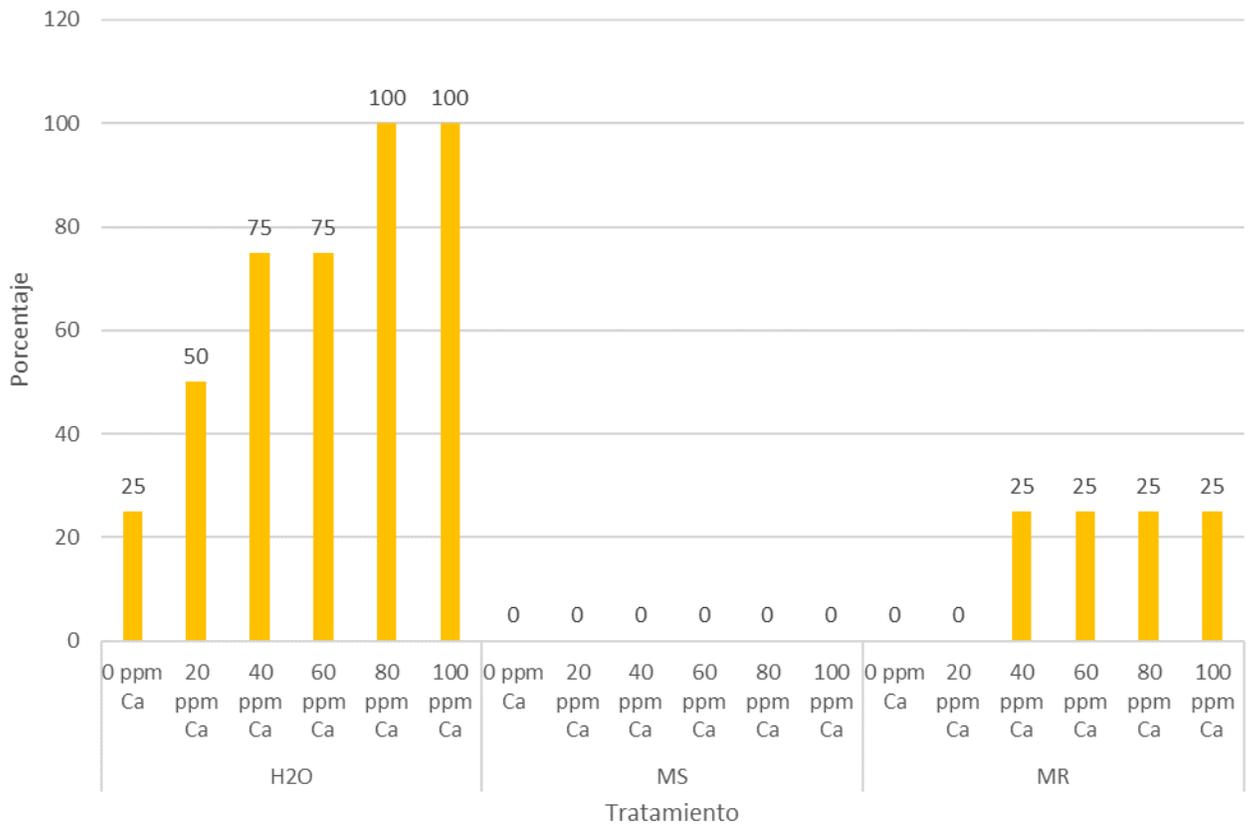


Figura 31. Porcentaje de unidades experimentales contaminadas para cada tratamiento evaluado.

La contaminación obtenida en el medio de agua destilada más Calcio, se atribuye a la falta de nutrientes minerales para el buen desarrollo de los explantes, por lo que los tejidos empiezan un proceso de descomposición y putrefacción, dando lugar al desarrollo de bacterias en el medio.

Para cada variable respuesta se obtuvo un promedio de las cuatro repeticiones por tratamientos, dichos promedios obtenidos se muestran en el Cuadro 17. Para cada una de las variables respuestas se realizó un análisis comparativo de cada uno de los tratamientos, identificando para cada medio la concentración de Calcio que indica el mayor valor obtenido.

En la Figura 32 se observa el comportamiento de cada uno de los tratamientos evaluados en el número promedio de raíces obtenidas por explante, se identificó que en agua con 20 ppm de Calcio se obtenía un promedio de 2 raíces por explante, sin embargo en el medio MS con 20 ppm de Calcio el promedio de raíces por explante correspondía a 39.5, así también en el medio MR con 60 ppm de Calcio el número promedio de raíces por explante fue de 78.7.

Cuadro 17. Datos promedio para las variables respuestas en cada uno de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Número promedio de raíces	Largo promedio de raíces	Número promedio de brotes	Tamaño promedio de brotes (cm)	Número promedio de plantas finales	Peso promedio de raíz (g)	
H2O	0 ppm Ca	1.75	1.70	7	6.98	10	0.014
	20 ppm Ca	2.00	0.50	2	5.93	5	0.009
	40 ppm Ca	0.00	0.00	2	5.73	4	0.000
	60 ppm Ca	0.25	0.05	2	4.68	5	0.001
	80 ppm Ca	0.00	0.00	1	6.03	3	0.000
	100 ppm Ca	0.75	0.35	3	7.57	6	0.008
MS	0 ppm Ca	20.25	0.98	9	12.30	12	0.113
	20 ppm Ca	39.50	1.48	12	15.03	15	0.178
	40 ppm Ca	19.25	1.53	9	13.60	12	0.058
	60 ppm Ca	16.25	0.83	10	14.15	13	0.165
	80 ppm Ca	19.75	0.90	10	12.25	13	0.045
	100 ppm Ca	22.50	1.30	11	11.60	14	0.123
MR	0 ppm Ca	69.25	2.48	10	12.40	13	0.240
	20 ppm Ca	74.75	2.48	10	10.88	13	0.198
	40 ppm Ca	62.33	1.50	8	10.37	11	0.180
	60 ppm Ca	78.67	1.73	10	9.30	13	0.277
	80 ppm Ca	65.00	1.43	10	7.97	13	0.260
	100 ppm Ca	76.67	1.48	11	14.53	14	0.470

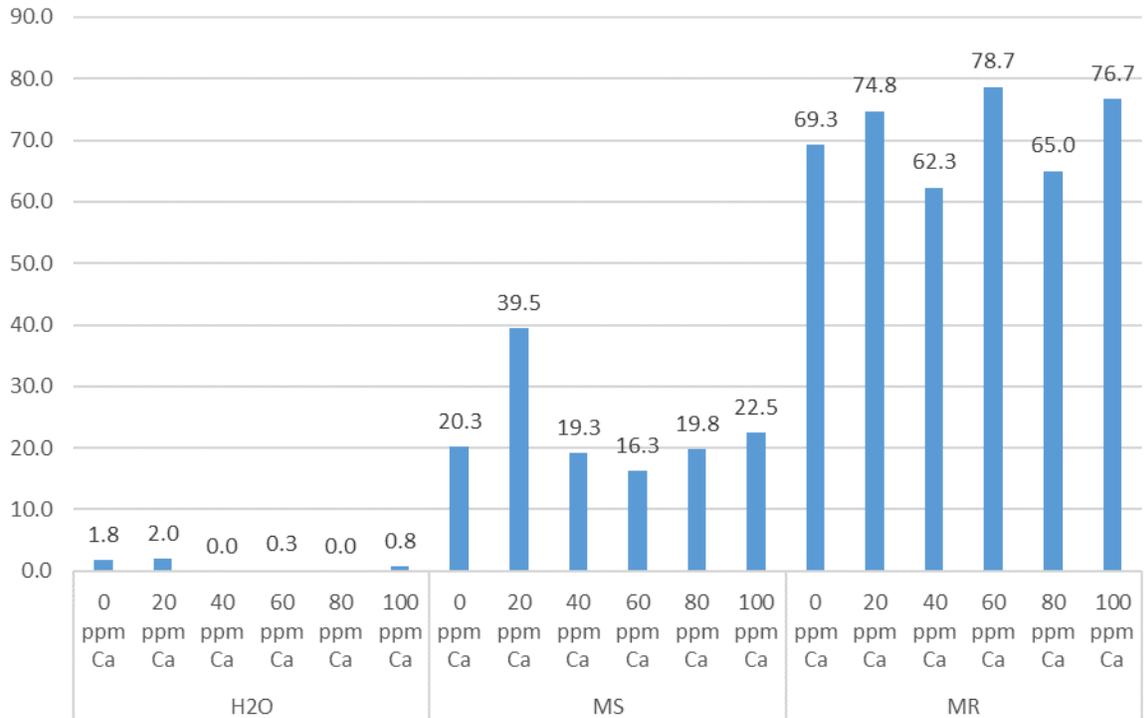


Figura 32. Número promedio de raíces adventicias obtenidas para cada tratamiento evaluado.

El alto número de raíces obtenidas por explante en el medio de cultivo MR con 60 ppm puede atribuirse a la combinación del Calcio y la auxina IBA; sin embargo, cabe mencionar que en dicho tratamiento se obtuvo un 25% de contaminación de los explantes.

En la Figura 33 se muestra la diferencia que existe en cuanto al número de raíces por explante, en la imagen 1 se observan las raíces adventicias obtenidas en agua con 20 ppm de Calcio, la imagen 2 representa al medio MS con 20 ppm de Calcio y la imagen 3 representa al medio MR con 60 ppm de Calcio.

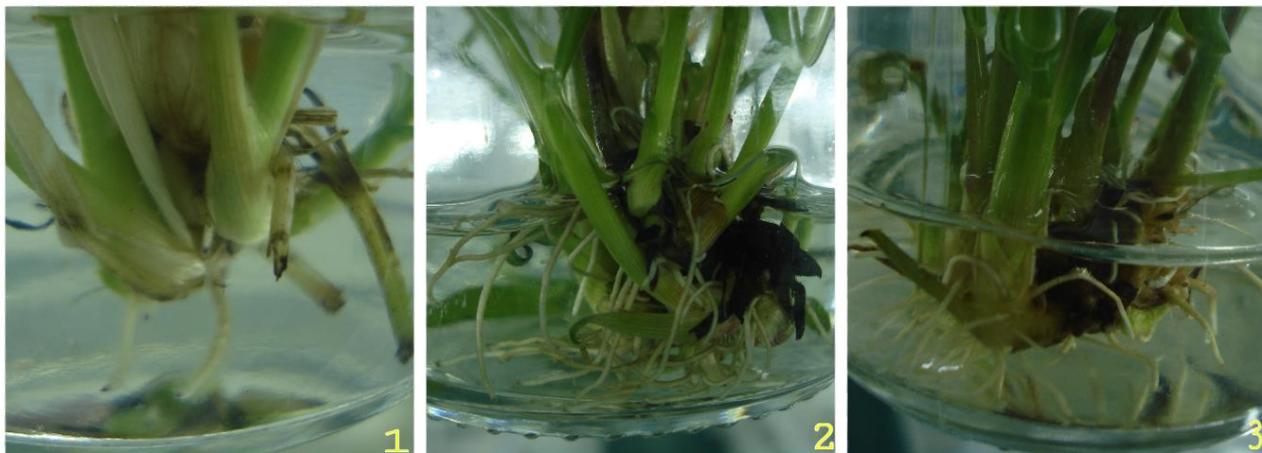


Figura 33. Raíces adventicias obtenidas en brotes de caña de azúcar. Agua con 20 ppm de Calcio (1); MS con 20 ppm de Calcio (2); MR con 60 ppm de Calcio (3).

En la Figura 35 se muestra una comparación del número y largo promedio de raíces obtenidas para cada tratamiento, identificando que en la mayoría de los tratamientos existe una relación directa entre estas dos variables, es decir que el medio de cultivo que es capaz de inducir un mayor número de raíces, también es capaz de inducir un buen desarrollo en ellas.

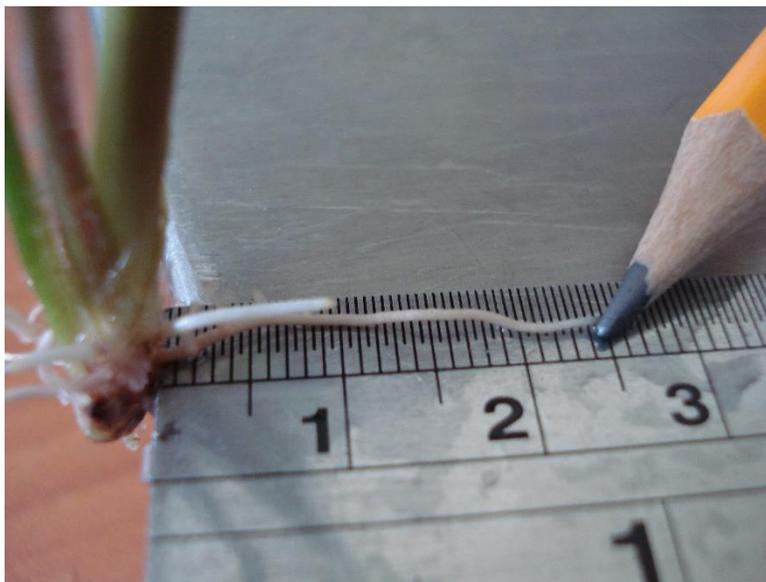


Figura 34. Representación del largo de raíces adventicias.

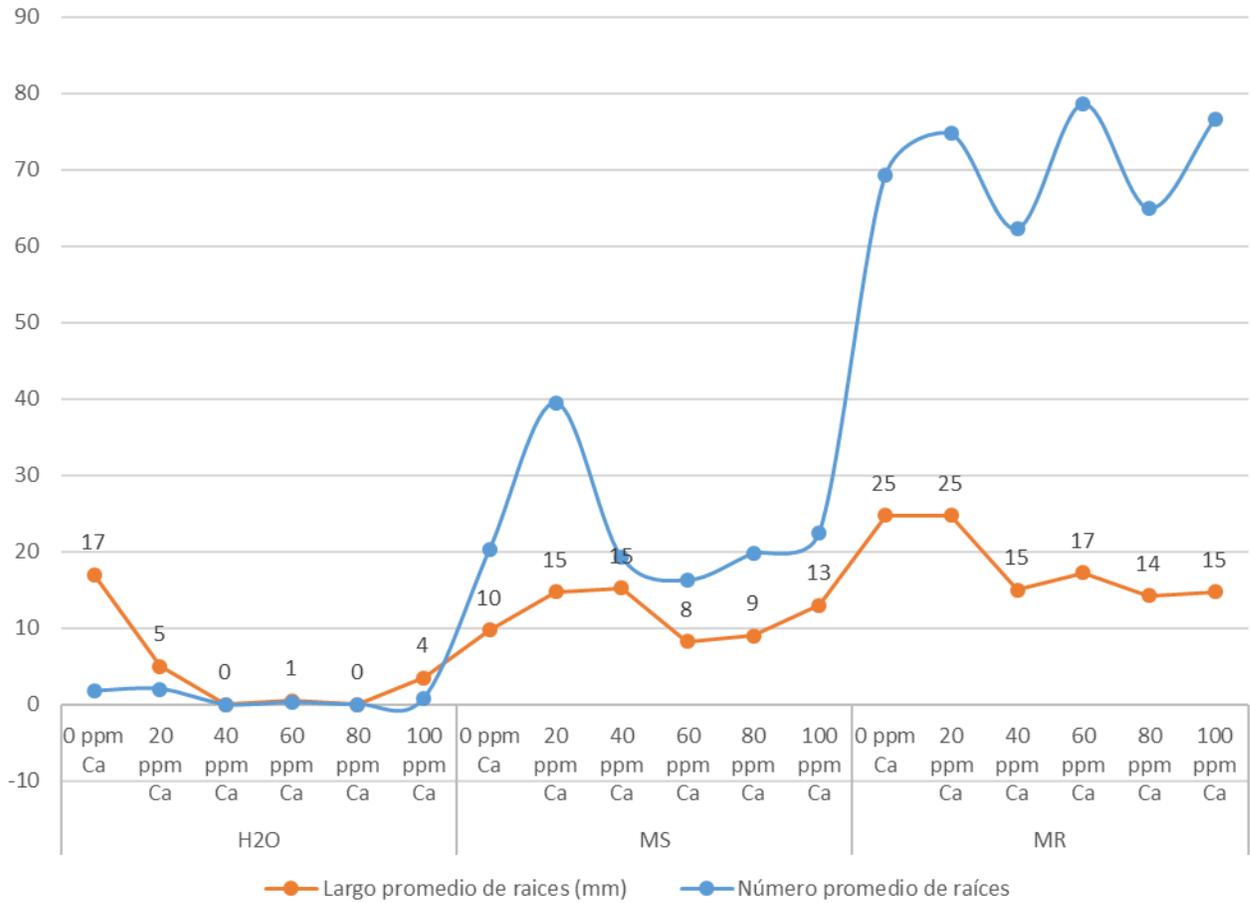


Figura 35. Comparación del número y largo promedio de raíces obtenidas.

En la Figura 36 se puede observar el comportamiento de la inducción de nuevos brotes para cada uno de los tratamientos, se identificaron los mejores valores obtenidos para cada medio; en el caso del tratamiento de agua con 0 ppm de Calcio, se obtuvo un promedio de 7 brotes por explante, esto puede ser parte de una respuesta de supervivencia de la planta, debido al estrés que se le estaba provocando al no suministrarle ningún tipo de nutrientes al medio.

En el caso del medio MS, el mayor valor obtenido corresponde a la adición de 20 ppm de Calcio con un número de 12 brotes promedio; en el medio MR el mayor valor obtenido corresponde a 11 brotes promedio con la utilización de 100 ppm de Calcio.

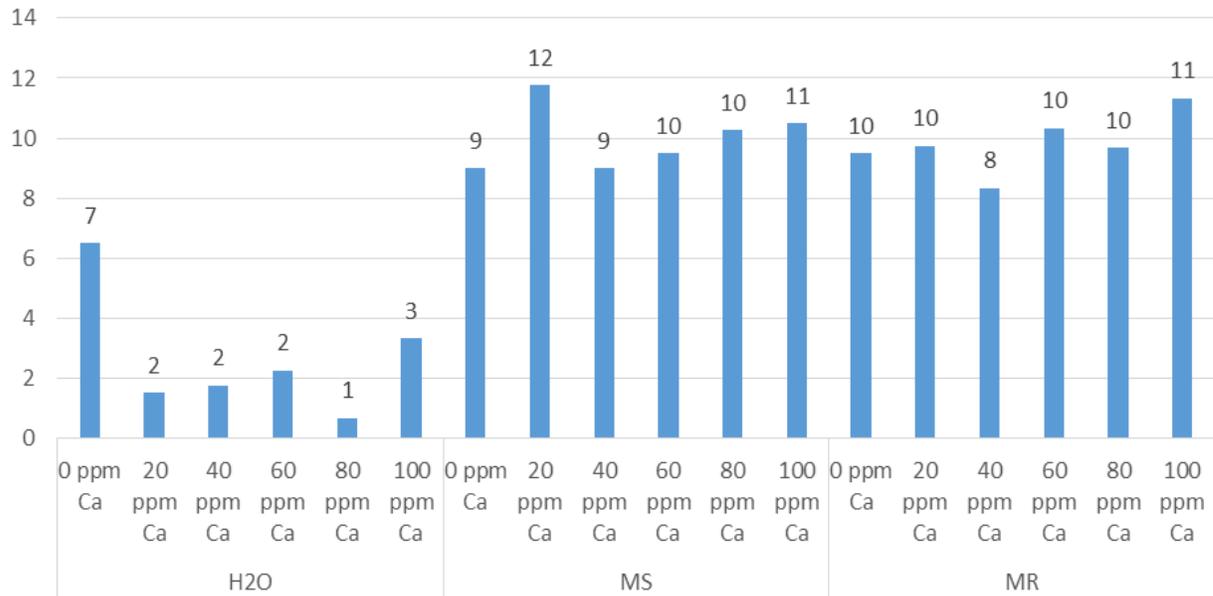


Figura 36. Número promedio de brotes inducidos.

La relación obtenida entre el número y largo de raíces es similar a la relación obtenida entre el número y tamaño de estos, debido a que los brotes presentan un mayor tamaño en aquellos tratamientos que presentan un mayor número de brotes, dicha comparación puede observarse en la Figura 38.



Figura 37. Nuevos brotes obtenidos en caña de azúcar.

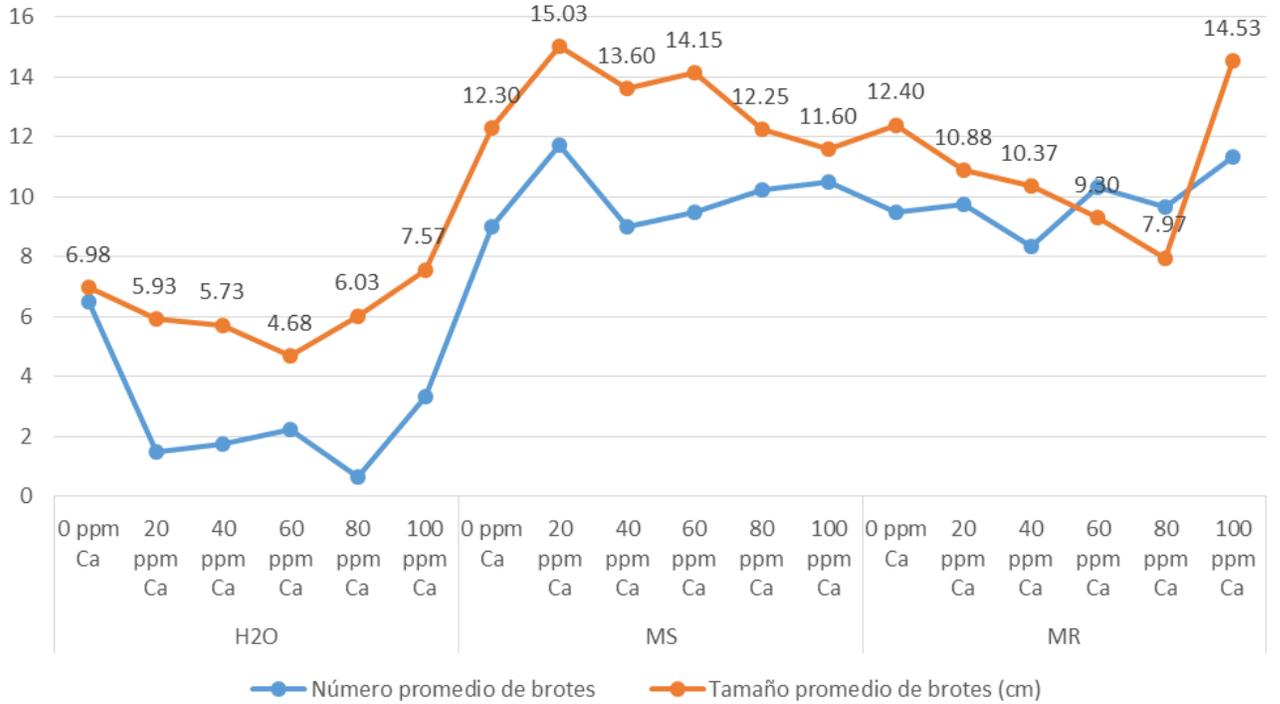


Figura 38. Comparación del número y tamaño de brotes obtenidos.

Las diferentes concentraciones de Calcio en agua no presentaron ningún efecto en cuanto a la formación de brotes, debido a que el mayor número y tamaño de brotes se obtuvo con la utilización de agua sin Calcio, sin embargo como se muestra en la Figura 39, los brotes presentan poco desarrollo y una coloración amarillenta.



Figura 39. Brotes obtenidos en agua con 0 ppm de Calcio.

Sin embargo, en la utilización del medio MS con 20 ppm de Calcio, se obtuvo un número promedio de 12 brotes, brotes que presentaban un tamaño promedio de 15cm. En la Figura 40 puede apreciarse la calidad de brotes obtenidos, debido a que son brotes bien definidos, presentan un buen desarrollo y una buena formación de macolla.



Figura 40. Brotes obtenidos en medio MS con 20 ppm de Calcio.

En el medio MR con 100 ppm de Calcio se obtuvo un número promedio de 11 brotes, tomando en cuenta que una repetición se perdió por contaminación (representa al 25% del tratamiento). En la Figura 41 pueden observarse que las macollas presentan un alto número de brotes, sin embargo, comparados con los brotes obtenidos en el medio MS, estos son menos desarrollados y vigorosos.



Figura 41. Brotes obtenido en el medio MR con 100 ppm de Calcio.

Según los datos obtenidos y las comparaciones realizadas para cada variable respuesta, el medio de cultivo MS en combinación con Calcio es capaz de la inducción y formación de raíces en brotes de caña de azúcar, obviamente en cuanto al número de raíces formadas, el medio MR presentó una mejor respuesta debido a que este medio se encuentra enriquecido con IBA, más sin embargo en ausencia de IBA, el Calcio podría ser un sustituyente.

En el medio de cultivo MS, los mayores valores se obtuvieron con la adición de 20 ppm de Calcio; por lo que este medio podría ser un ideal sustituto del medio MR para la etapa de enraizamiento, debido a que el calcio presenta una buena respuesta en la formación de brotes y raíces.

Para conocer el medio de cultivo que presenta mejor respuesta, sin influencia de Calcio; se tomaron en cuenta los tratamientos con 0 ppm de Calcio.

Los datos se muestran en el Cuadro 18, observando que para cada una de las variables respuestas el medio MR con 0 ppm de Calcio presenta los valores más altos con respecto

a los otros dos tratamientos; y esto posee una explicación lógica, debido a que este medio de cultivo está enriquecido con 1 mg/L de IBA.

Cuadro 18. Resultados obtenidos para cada medio de cultivo con 0 ppm de Calcio.

Tratamiento	Descripción de tratamientos	Número promedio de raíces	Largo promedio de raíces (cm)	Número promedio de brotes	Tamaño promedio de brotes (cm)	Número promedio de plantas finales	Peso promedio de raíz (g)
1	H2O	2.33	2.27	6.50	6.98	10	0.01
7	MS	20.25	0.98	9.00	12.30	12	0.11
13	MR	69.25	2.48	9.50	12.40	13	0.24

#### 3.4.4 Conclusiones

- El medio de cultivo que presenta una mayor emisión de raíces en caña de azúcar es el medio MR.
- El medio de cultivo MR con 60 ppm de Calcio, presenta un mayor porcentaje de formación de raíces en caña de azúcar.
- Los medios de cultivo suplementados con Calcio, presentaron una mejor respuesta en cuanto a la formación de brotes y raíces adventicias, por lo que demuestra que el Calcio actúa como un regulador de crecimiento.
- El medio MS con 20 ppm de Calcio es capaz de sustituir el medio MR, debido a que presenta los mayores valores obtenidos en cada una de las variables respuestas.

### **3.5 EFECTO DE TRES MÉTODOS DE DESINFECCIÓN EN YEMAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*) PARA LA EXTRACCIÓN DE MERISTEMOS.**

#### **3.5.1 Objetivos**

##### **3.5.1.1 General**

Evaluar tres métodos de desinfección en yemas de caña de azúcar para la extracción de meristemos.

##### **3.5.1.2 Específicos**

- a. Determinar el método de desinfección que presente mayor porcentaje de contaminación y muerte de meristemos.
- b. Determinar el método que presente mayor porcentaje de meristemos libres de contaminación.
- c. Plantear recomendaciones para la mejora de los resultados en la obtención de meristemos de caña de azúcar.

#### **3.5.2 Metodología**

##### **3.5.2.1 Descripción de tratamientos**

Los métodos de desinfección que fueron utilizados durante la evaluación son detallados a continuación:

##### **A. Método 1**

Este método es el que se utiliza tradicionalmente para la desinfección de yemas de caña de azúcar dentro del laboratorio; dicho proceso se lleva a cabo en dos diferentes áreas, en el área de recepción de material vegetal (Cuadro 19) se realiza una desinfección previa al corte de los brotes meristemáticos (comúnmente llamados “toletes” (Figura 42)) y la eliminación de los folíolos externos; los cuales, posteriormente son sumergidos en una solución desinfectante.

Cuadro 19. Método tradicional para la desinfección y limpieza de toletes de caña en el área de recepción de material vegetal.

<b>Tiempo</b>	<b>Solución-Concentración</b>	<b>Observaciones</b>
35 min	Cloro al 33%+Tween20	Seguidamente se realiza un lavado con agua corriente y el corte de los brotes meristemáticos.
15 min	Cloro al 20%+Tween20	Posteriormente son eliminados al menos dos folíolos que envuelven los brotes meristemáticos.
10 min	Cloro al 16%+Tween20	

Posterior a recibir una desinfección previa, los toletes son ingresados al área de multiplicación (Cuadro 20), en donde son desinfectados en una cámara de flujo laminar y preparados para la extracción de meristemas.

Cuadro 20. Método tradicional para la desinfección de toletes en el área de multiplicación.

<b>Tiempo</b>	<b>Solución-Concentración</b>	<b>Observaciones</b>
5 min	Alcohol al 75%	Al final de la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar se realiza un triple lavado con agua destilada estéril.
10 min	Cloro al 33%+Tween20	
10 min	Cloro al 33%+Tween20	

## **B. Método 2**

En este método el agua corriente fue sustituida por agua destilada y se redujeron los tiempos de desinfección en solución de Cloro, tanto en el área de recepción de material vegetal (Cuadro 21), como en el área de multiplicación (Cuadro 22).

Cuadro 21. Método 2 para la desinfección y limpieza de toletes de caña en el área de recepción de material vegetal.

<b>Tiempo</b>	<b>Solución-Concentración</b>	<b>Observaciones</b>
20 min	Cloro al 25%	Seguidamente se realizó el corte de los brotes meristemáticos.
	Agua destilada	Posteriormente son eliminados al menos dos folíolos que envuelven los brotes meristemáticos.
5 min	Cloro al 20%	

Cuadro 22. Método 2 para la desinfección de toletes en el área de multiplicación.

<b>Tiempo</b>	<b>Solución-Concentración</b>	<b>Observaciones</b>
5 min	Alcohol al 75%	Al final de la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar se realizó un triple lavado con agua destilada estéril.
15 min	Cloro al 35%	

### **C. Método 3**

En este método se realizó un lavado profundo de las yemas con agua corriente y solamente un tiempo de desinfección con hipoclorito de Calcio en el área de recepción de material vegetal (Cuadro 23), en el área de multiplicación también se sustituyó el Cloro comercial por hipoclorito de Calcio (Cuadro 24).

Cuadro 23. Método 3 para la desinfección y limpieza de toletes de caña en el área de recepción de material vegetal.

<b>Tiempo</b>	<b>Solución-Concentración</b>	<b>Observaciones</b>
20 min	Agua corriente	Seguidamente se realizó el corte de los brotes meristemáticos.
	Agua destilada	Posteriormente son eliminados al menos dos folíolos que envuelven los brotes meristemáticos.
5 min	Hipoclorito de calcio al 10%	

Cuadro 24. Método 2 para la desinfección de toletes en el área de multiplicación.

Tiempo	Solución-Concentración	Observaciones
1 min	Alcohol al 75%	Al final de la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar se realizó un triple lavado con agua destilada estéril.
10 min	Hipoclorito de calcio al 5%	



Figura 42. Brotes meristemáticos de caña de azúcar (toletes).



Figura 43. Toletes después de la eliminación de foliolos externos.

### 3.5.2.2 Siembra e incubación

Posteriormente a la desinfección de los toletes en el área de multiplicación (Figura 44), se procedió a la extracción de meristemos (Figura 45); los cuales fueron sembrados en tubos de ensayo con medio de cultivo MS.



Figura 44. Toletes desinfectados, listos para la extracción de meristemos.



Figura 45. Extracción de meristemos en caña de azúcar.

Después de la siembra las plantas fueron trasladadas a la sala de desarrollo, en donde las condiciones de incubación se encontraban alrededor de 25°C de temperatura y un fotoperiodo de 16 horas.

### **3.5.2.3 Variables respuestas**

- Porcentaje de contaminación provocada por bacterias.
- Porcentaje de contaminación provocada por hongos.
- Porcentaje de mortalidad.
- Porcentaje de meristemas libres de contaminación.

### **3.5.2.4 Toma de datos**

Para cada uno de los tratamientos, se realizaron cuatro lecturas a cada cinco días, eliminando inmediatamente, después de cada lectura, aquellos tubos de ensayo contaminados.

### **3.5.2.5 Análisis de la información**

A los valores de las variables evaluadas se les aplicó un análisis descriptivo con base en porcentajes y medias obtenidas, para la posterior elaboración de cuadros y figuras, obteniendo una mejor ilustración de las respuestas obtenidas.

## **3.5.3 Resultados y Discusión**

Después de que los meristemas permanecieran 20 días en el medio de cultivo, se realizó la última lectura, determinando para cada uno de los métodos evaluados el porcentaje de contaminación total provocada por bacterias y hongos.

En el Cuadro 25 se muestra el número y el porcentaje de meristemas contaminados por bacterias, los cuales fueron identificados por presentar una consistencia lechosa en el medio de cultivo; es posible observar que en todos los métodos utilizados existen valores muy elevados de contaminación por bacterias, sin embargo el método 2 presenta el menor porcentaje de contaminación con un 62.24%.

Cuadro 25. Número y porcentaje de meristemos contaminados por bacterias.

<b>Método</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
1	68	69.39 %
2	61	62.24 %
3	83	88.30 %

En el Cuadro 26 se muestra el número y el porcentaje de meristemos contaminados por hongos, los cuales fueron identificados por presentar micelio en el medio de cultivo; dentro de los métodos evaluados el método 3 presenta un mayor porcentaje de contaminación con 7.44 %.

Cuadro 26. Número y porcentaje de meristemos contaminados por hongos.

<b>Método</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
1	4	4.08 %
2	4	4.08 %
3	7	7.44 %

En el Cuadro 27 se muestra el número y porcentaje de mortalidad de meristemos para cada uno de los métodos evaluados, es posible observar que el método 3 presentó un menor porcentaje con 3.19 %.

Cuadro 27. Número y porcentaje de mortalidad de meristemos.

<b>Método</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
1	17	17.35 %
2	16	16.33 %
3	3	3.19 %

La mortalidad en el método 1 y 2 pudo ser influenciada por las altas concentraciones de Cloro utilizadas, lo que pudo haber provocado quemaduras o muerte del material vegetal; ya que en el método 3 se utilizaron bajas concentraciones de hipoclorito de Calcio con menores tiempo de inmersión, los daños provocados fueron menores.

En el Cuadro 28 se presenta el número y porcentaje total de meristemos libres de contaminación, en donde el método 2 obtuvo un mayor porcentaje de meristemos libres de contaminación, con un 17.35 %.

Cuadro 28. Número y porcentaje de meristemos libres de contaminación.

Método	Número	Porcentaje
1	9	9.18 %
2	17	17.35 %
3	1	1.06 %

En la Figura 46 es posible observar el comportamiento de cada una de las variables en cada método de desinfección evaluado, siendo el método 2 con menor porcentaje de contaminación provocada por bacterias, hongos y un mayor porcentaje de meristemos libres de contaminación.

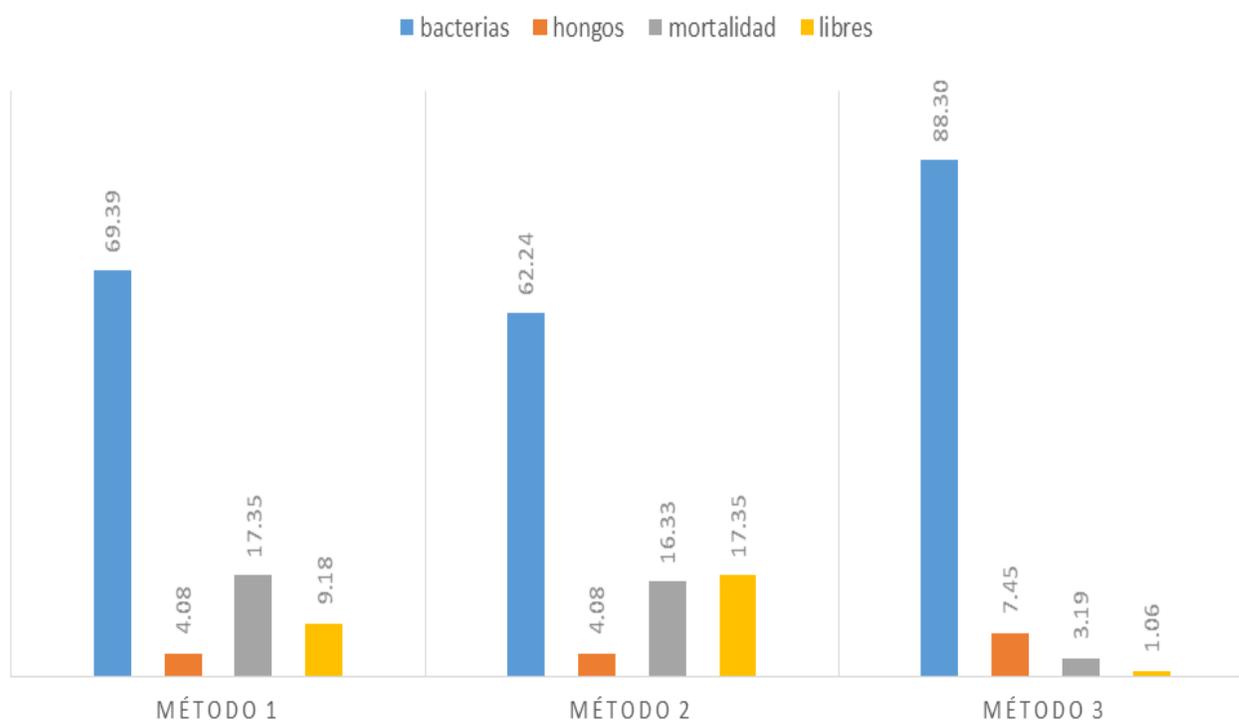


Figura 46. Porcentaje de contaminación, mortalidad y meristemos libres para cada uno de los métodos evaluados.

Considerando el método 2 como el mejor método para la obtención de meristemos libres de contaminación, más sin embargo este posee un alto porcentaje de mortalidad de meristemos sembrados (16.33 %), es posible suponer que los meristemos permanecieron más tiempo de lo recomendado en el medio de cultivo, por lo que la mortalidad puede

verse afectada por la oxidación de los explantes, liberación de bacterias endógenas, falta de nutrientes, entre otros factores. Por lo que en la

Figura 47 se representa el comportamiento de contaminación-muerte acumulativa de los meristemos comparada con la obtención de meristemos libres.

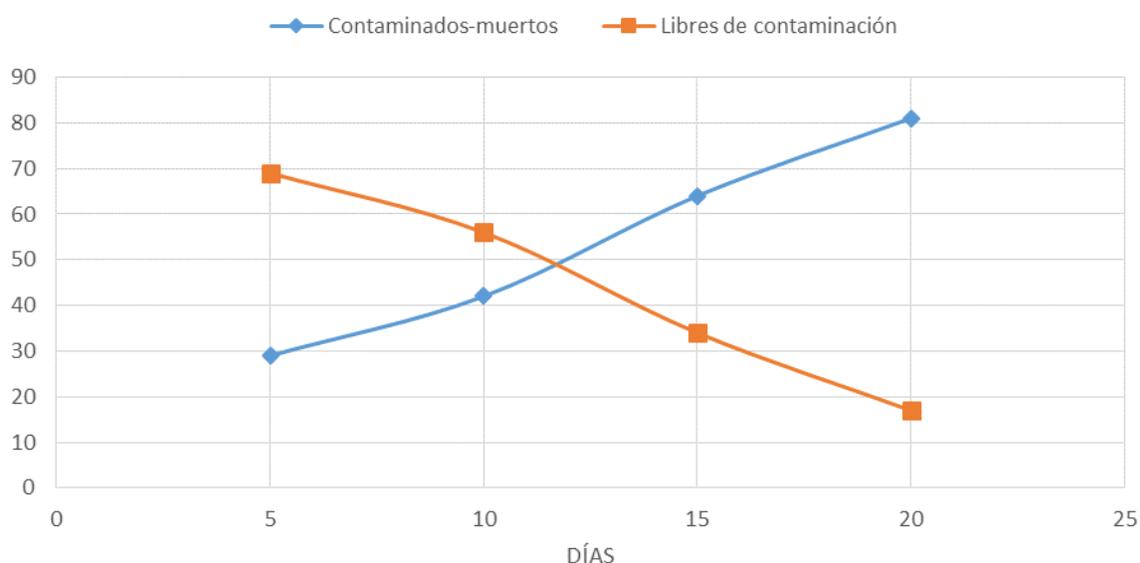


Figura 47. Número de meristemos contaminados-muertos vs. meristemos libres de contaminación.

Es posible observar que la contaminación y muerte de meristemos aumenta en el tiempo, por lo que sería recomendable tener mayor control de calidad en el área de invernadero, antes de ingresar las yemas al laboratorio o bien implementar un tratamiento térmico dentro del laboratorio, ya que existen dos unidades térmicas que provee las condiciones adecuadas para un tratamiento térmico y que actualmente no están siendo utilizadas.

Por otro lado se recomienda el uso de la técnica de extracción de meristemos, descrita por CENGICAÑA (Molina, Maddaleno, Sut, Ovalle, & García, 2012), debido a que en la metodología de extracción utilizada actualmente los meristemos aún son sembrados con folíolos de gran tamaño (1 a 2 cm de largo) mientras que lo recomendado es obtener meristemos con un tamaño de 1 a 2 mm con dos primordios foliares.

### 3.5.4 Conclusiones

- a. El método 3, en el cual se utilizaba hipoclorito de calcio como sustituyente del cloro comercial, presentó un mayor porcentaje de contaminación y muerte de meristemas con un 98.94%.
- b. El mayor porcentaje de meristemas libres de contaminación se obtuvo al aplicar el método 2, obteniendo un 17.35% de meristemas libres.
- c. Recomendaciones para la obtención de mejores resultados:
  - El proceso de estimulación de brotación de yemas podría realizarse en las unidades térmicas interiores de la biofábrica, debido a que estas se encuentran en la capacidad de proveer las condiciones de termoterapia para la eliminación de patógenos.
  - Reducir los tiempos de desinfección en cloro, ya que los brotes meristemáticos pueden verse afectados por la concentración y tiempo que permanecen dentro de la solución.
  - El método 2 podría ser un buen sustituyente del método utilizado tradicionalmente.
  - Realizar la extracción de meristemas como lo recomienda CENGICAÑA, dejando solamente el meristemo, debido a que una mala extracción de meristemas no presentará ventajas en la propagación in vitro.

### 3.6 BIBLIOGRAFÍA

1. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT). 1994. Morfología de la caña de azúcar. Guatemala. 10 p. Folleto no. 2
2. FAO, IT. s.f. Manual técnico BPA y BPM de la caña de azúcar. Colombia, CORPOICA. Consultado 12 nov. 2014. Disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1525s/a1525s02.pdf>
3. Fenn, SE. s.f. Minerales del recreo (en línea). Argentina. Consultado 14 mayo 2012. Disponible en <http://www.asufrar.com.ar/pdf/elusodelcalcio.pdf>

4. Flores, S. 1976. Manual de caña de azúcar. Guatemala, Instituto Técnico de Capacitación y Productividad. 172 p.
5. Molina, L; Maddaleno, C; Sut, V; Ovalle, W; García, S. 2012. Saneamiento de material vegetal mediante cultivo de meristemos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbridos) y desarrollo de protocolos de multiplicación *in vitro*. Guatemala, CENGICANA. Consultado 26 ene 2014. Disponible en <http://www.cengicana.org/es/publicaciones/libro-de-la-cana-de-azucar/func-startdown/527/>
6. Subirós Ruiz, F. 2000. El cultivo de la caña de azúcar. San José, Costa Rica, EUNED. 448 p.
7. Victoria, J; Calderón, H. 1995. Establecimiento de semilleros y multiplicación de variedades en CENICAÑA: el cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Cali, CENICAÑA. p. 115-129.
8. Villatoro, B; Pérez, O. 2014. Caracterización de la zona cañera en el cultivo de la caña de azúcar en Guatemala. Guatemala, CENGICANA. Consultado 16 mayo 2014. Disponible en <http://www.cengicana.org/es/mapas-zona-canera/Libro-Ca%C3%B1a-de-Az%C3%BAcar/Art%C3%ADculos-Libro-El-Cultivo-de-la-Ca%C3%B1a-de-Az%C3%BAcar/orderby,6/>
9. Yáñez Reyes, JN. 2002. Nutrición y regulación del crecimiento en hortalizas y frutales. Coahuila, México, WATTS. Consultado 20 mayo 2014. Disponible en <http://www.uaaan.mx/postgrado/images/files/hort/simposio2/Ponencia03.pdf>