

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
ESCUELA DE BIOLOGIA**



**Para optar al título de
Biólogo**

Guatemala, junio de 1997

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

06
T(1815)
C.4

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO: Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

SECRETARIO: Lic. Oscar Federico Nave Herrera

VOCAL I: Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez

VOCAL II: Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

VOCAL III: Lic. Rodrigo Herrera San José

VOCAL IV: Br. Ana María Rodas Cardona

VOCAL V: Br. Hayro Oswaldo García García

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **CENTRO GUATEMALTECO DE INVESTIGACION Y CAPACITACION EN CAÑA DE AZUCAR (CENGICAÑA)**, el financiamiento para la realización de esta investigación y principalmente al asesor de este trabajo, director del programa de variedades de CENGICAÑA, Ph D. en Mejoramiento Genético Gregorio J. Soto Guevara, por sus valiosos comentarios, su amistad y apoyo a este estudio.

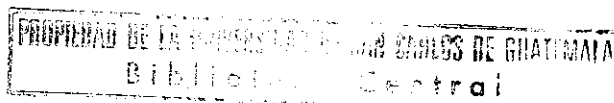
Al personal de la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas, principalmente al Ingeniero Agrónomo Luis Molina, por su colaboración, por proporcionar el equipo y reactivos usados y por permitirme desarrollar en su laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, la parte experimental de esta tesis.

A la Licenciada Roselvira de Klee, revisora de tesis, quien hizo valiosas sugerencias para mejorar este documento.

Al Ph D. Juan Fernando Hernández, su ayuda en el análisis estadístico de los resultados y por la amistad y apoyo brindado.

A Ana Carolina Rosales Zamora su ayuda y apoyo.

A mis padres y hermanos.



INDICE

1.	RESUMEN	.1
2.	INTRODUCCION	.2
3.	ANTECEDENTES	.4
3.1.	Clasificación botánica de: caña de azúcar	.4
3.2.	Características de las variedades estudiadas	.4
3.3.	Cultivo de tejidos vegetales	.6
3.3.1.	Cultivo de tejidos de caña de azúcar	.5
3.4.	Aplicaciones del cultivo de meristemas	.6
3.4.1.	Micropropagación	.6
3.4.2.	Micropropagación de Caña de Azúcar	.8
3.4.3.	Eliminación de Enfermedades	.8
3.4.4.	Eliminación de enfermedades virosas en caña de azúcar	.9
3.5.	Factores que Influyen en el Exito del Cultivo de Meristemas	.9
4.	JUSTIFICACIONES	.12
5.	OBJETIVOS	.14
6.	HIPOTESIS	.15
7.	MATERIALES Y METODOS	.16
7.1.	Universo del Trabajo	.16
7.1.1.	Medios	.16
7.1.2.	Recursos Humanos	.16
7.1.3.	Recursos Materiales	.16

7.2.	Materiales16
7.2.1.	Material de Estudio16
7.2.2.	Equipo16
7.2.3.	Reactivos17
7.3.0.	Procedimiento18
7.3.1.	Explicación general del presente estudio18
7.3.2.1	Metodología para la propagación <u>in vitro</u> de caña de azúcar a partir de ápices19
7.3.2.1.	Preparación de soluciones madre19
7.3.2.2.	Preparación de medios de cultivo19
7.3.2.3.	Desinfección19
7.3.2.4.	Siembra20
7.3.3.	Tratamientos por Variedad20
7.4	Diseño estadístico20
8.	RESULTADOS21
9.	DISCUSION28
10.	CONCLUSIONES30
11.	RECOMENDACIONES31
12.	BIBLIOGRAFIA32
13.	ANEXOS34

1. RESUMEN

El presente estudio tuvo por objeto llevar a cabo la propagación *in vitro* de caña de azúcar en medio líquido utilizando las variedades Mex 68P23, CP 721210 y Ja 6419.

La metodología que se probó es la utilizada por CENICAÑA en Colombia, con la cual se comparó la sobrevivencia de las tres variedades, la sobrevivencia de tres tamaños de ápice (1, 3 y 5 mm) y el efecto antioxidante del ácido cítrico a una concentración de 150 mg/l y de L-cisteína a una concentración de 50 mg /l.

Respecto a la sobrevivencia varietal, se encontró que hubo diferencia significativa entre las proporciones de sobrevivientes de las tres variedades; teniendo la mayor sobrevivencia la variedad Ja 6419 y la menor, la variedad Mex 68P23.

En la sobrevivencia de los ápices se observó que los ápices de 1 mm. no deben utilizarse con esta metodología, ya que ninguno de estos se desarrolló, sí resultó efectiva para los ápices de 3 y 5 mm.

En relación a la efectividad de los antioxidantes, el ácido cítrico a una concentración de 150 mg/l fue efectivo para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos en la caña de azúcar durante la propagación *in vitro* de las tres variedades y los tres tamaños de ápice estudiados. A diferencia del anterior, la L-cisteína a concentraciones de 50 mg/l no fue efectiva en la micropropagación de caña de azúcar en ninguno de los tres tamaños de ápice de las tres variedades utilizadas.

2. INTRODUCCION

La caña de azúcar (Saccharum sp.) es un cultivo muy importante para Guatemala, por ser fuente de divisas, de empleo y por sus productos primarios y secundarios (1).

Actualmente en Guatemala, la propagación de la caña de azúcar en plantaciones comerciales se realiza exclusivamente por medios convencionales, a partir de material vegetativo, necesitándose varios años para obtener suficiente material de un clon con fines comerciales (2).

La propagación in vitro a partir de meristemos de caña de azúcar tiene muchas ventajas, entre ellas están: obtención de plantas libres de patógenos (virus, bacterias y hongos); propagación acelerada; clones que pueden ser propagados en cualquier época del año; agilización del intercambio de germoplasma de un país a otro; reducción en el tiempo de los programas de mejoramiento genético y posibilidad de su utilización en estudios fisiológicos (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

La caña de azúcar es de los cultivos más difíciles de propagar in vitro, principalmente debido a que ésta produce gran cantidad de productos fenólicos, que al oxidarse forman quinonas (substancias que normalmente protegen a la planta del ataque de patógenos), que matan a las plantas cultivadas in vitro (6, 10).

En el presente estudio, se trató de propagar tres variedades de caña de azúcar (las variedades usadas en este estudio fueron producidas a partir de cruces entre varias especies del género

Saccharum, es por eso que al poner el nombre científico no se ha puesto la especie.) *in vitro*, a partir de meristemas, en medio líquido (el medio líquido es más barato y ayuda a evitar la oxidación); así mismo se trató de evitar el problema de la oxidación de los compuestos fenólicos, por medio de agentes químicos antioxidantes (ácido cítrico y L-cisteína), añadidos al medio de cultivo.

Los resultados de este estudio demuestran que existe diferencia varietal en la capacidad de sobrevivencia entre las variedades evaluadas, ya que hubo diferencia significativa entre las proporciones de sobrevivientes de las tres variedades. La variedad Ja 6419 fue la que presenta mayor sobrevivencia y la variedad Mex 68P23 fue la que presentó la menor sobrevivencia.

También se encontró que los ápices de 1 mm no se desarrollaron si se usaba esta metodología, mientras que para los de 3 y 5 mm, sí fue efectiva.

En relación a la efectividad de los antioxidantes , el ácido cítrico a una concentración de 150 mg/l fue efectivo para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos de las tres variedades y los tres tamaños de ápice estudiados. A diferencia del anterior, la L-cisteína a concentraciones de 50 y 100 mg/l no fue efectiva en la micropropagación de caña de azúcar en ninguno de los tres tamaños de ápice de las tres variedades utilizadas.



3. ANTECEDENTES

3.1. Clasificación botánica de caña de azúcar (Cronquist, 1981)

REINO: Plantae

SUBREINO: Embryobionta

DIVISION: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsida

SUBCLASE: Commelinidae

ORDEN: Cyperales

FAMILIA: Poaceae

SUBFAMILIA: Panicoideae

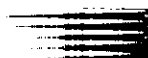
GENERO: Saccharum

ESPECIE: Saccharum sp.

3.2 Características de las Variedades Estudiadas

3.2.1 Variedad Ja 6419

Esta variedad fué desarrollada en Guatemala y Cuba. Alcanza en promedio alturas de 3.3 m y diámetro de 20 a 35 mm con una insidencia de corcho de 14.2 %. En cuanto a producción se registran 12.58 toneladas por hectárea/mes, con 91.3 kg de azúcar por tonelada y 14.35 % de fibra. Su reacción a enfermedades foliares se reporta como resistente a mosaico (Virus SCMV), carbón (Ustilago scitaminea) y escaldadura (Xanthomonas albilineans); se reporta medianamente susceptible a roya (Puccinia melanocephala) con una incidencia del 1 %; medianamente susceptible a peca amarilla (Mycovellosiella koepkei) y mancha púrpura (Dimeriella sacchari) con 2 y 3 % de incidencia, respectivamente. La intensidad de infestación por barrenadores es de un 1.79 % (11).



3.2.2 Variedad CP 721210

Esta variedad fue desarrollada en Estados Unidos de Norte América. Alcanza en promedio una altura de 2.18 m y diámetro de 90 mm; con una incidencia de corcho de 28.8%. En cuanto a la producción se registran 11.9 toneladas métricas por hectárea/mes, con 112 kg de azúcar por tonelada. Su reacción a enfermedades foliares se reporta como resistente a carbón y escaldadura; medianamente resistente a roya con 1 % de incidencia; medianamente susceptible a mancha púrpura con 3 % de incidencia. Sufre una intensidad de infestación por barrenador (*Diatrea* sp.) de 1.72% (11).

3.3.3 Variedad Mex 68P23

Esta variedad fue desarrollada en México. Alcanza en promedio alturas de 3.10 m y diámetros promedio de 100 mm; sin floración; presenta una incidencia de corcho de 7.1 %. En cuanto a la producción se registran 11.59 toneladas métricas por hectárea/mes, con 90 kg. de azúcar por tonelada y 12.55 % de fibra. Su reacción a enfermedades foliares se reporta como resistente a: mosaico (Virus, SCMV), carbón, mancha púrpura, peca amarilla y escaldadura y medianamente susceptible a la roya con 1 % de incidencia (11). Presenta una intensidad de infestación por barrenador de un 1.68%.

3.3. Cultivo de Tejidos Vegetales

Comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, como: protoplasto, célula, tejido u órgano entre otros) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. (3,6)

Los objetivos perseguidos en la utilización del cultivo de tejidos *in vitro* son numerosos. Las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir en: estudios básicos de fisiología,

genética, bioquímica y ciencias afines; producción de metabolitos secundarios, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos; propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma. (2,3,4,5,6,)

3.3.1. Cultivo de Tejidos de caña de azúcar

Las investigaciones sobre cultivo de tejidos y células de caña de azúcar comenzaron en Hawaii en 1961 en el "Hawaiian Sugarcane Research Center". Después, se iniciaron en Taiwan las investigaciones de cultivo de tejidos y células para el mejoramiento de la caña de azúcar desde 1970 en el "Taiwan Sugar Research Institute". Posteriormente se formaron otros institutos de investigación sobre cultivo de tejidos en caña de azúcar; los principales están en: Florida, U.S.A., Filipinas, Brazil, Francia, Cuba, Colombia y México (2,4).

Algunas plantas se propagan más fácilmente in vitro (geranio, piña, clavel, etc.), mientras que otras plantas, incluyendo la caña de azúcar, presentan mayor dificultad. Generalmente es más difícil propagar in vitro a las monocotiledóneas que a las dicotiledóneas (5).

El cultivo de tejidos de caña de azúcar se dificulta, ya que esta planta posee algunos compuestos fenólicos que se oxidan y los productos de esta oxidación inhiben la actividad enzimática del tejido y lo matan (10,19).

3.4. Aplicaciones del Cultivo de Meristemos

3.4.1. Micropropagación

Esta alternativa de propagación asexual es una técnica utilizada en cultivos tan diversos como piña, uva, fresa, café, banano, hule, diversas variedades de cactus, palmeras, caña de azúcar, etc (3,6,9). El tamaño del propágulo en cultivo es tan pequeño que la técnica recibe el nombre de micropropagación o propagación in vitro. En esta técnica no se usa el meristemo exactamente ya

que no es el objetivo eliminar enfermedades. El uso de explantes grandes es deseable ya que son más fáciles de disectar y tienen mayores tasas de sobrevivencia y crecimiento que los explantes pequeños (3,4,6,7,8).

El uso de los términos "meristemas" y "ápices" está condicionado al tamaño del explante y al tipo de tejido contenido en él. Anatómicamente, el meristemo consiste en el domo (células no diferenciadas de carácter embrionario y con dimensiones no mayores de 0.1 mm de longitud). Por otro lado, los ápices meristemáticos se refieren al domo, con uno o varios primordios foliares y de tamaño variable (3,4,6,18).

La propagación in vitro se lleva a cabo en tres etapas: (1) iniciación o establecimiento, (2) multiplicación de brotes y (3) enraizamiento (3,4,6).

La propagación in vitro presenta las siguientes ventajas en comparación con el método tradicional: a) a partir de una sola planta se pueden regenerar miles de clones en un año que en comparación con las técnicas convencionales tardaría varios años para lograrse. b) Se reduce el tiempo de multiplicación. c) Se logra la multiplicación de grandes cantidades en una superficie reducida, a bajos costos y en menos tiempo. d) Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga. e) La técnica in vitro provee un método de rápido intercambio internacional de material vegetal ya que elimina el peligro de introducción de enfermedades, haciendo innecesario el período de cuarentena. f) Las plantas in vitro pueden ser multiplicadas en cualquier época del año, mientras que las técnicas convencionales son altamente dependientes de la estación. g) Además, permiten propagar variedades de las cuales sólo existen pocos individuos. h) Las plantas derivadas de meristemas son fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta madre. i) Las plantas obtenidas a partir de la micropropagación son más vigorosas que la planta madre (5,6,7,8,9)

El coeficiente de multiplicación de la caña de azúcar es bajo y por ello la multiplicación in vitro de este cultivo es útil (7,8,9)

3.4.2. Micropropagación de caña de azúcar

En la micropropagación de caña de azúcar se prefiere emplear meristemas apicales por estar libres de contaminación y porque presenta menos problemas de oxidación de compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos indican que, se pueden obtener 10,000 plantas de caña de azúcar en un año a partir de un solo meristemo y esta cantidad podría llegar a cuadruplicarse. En 1984, Lee propagó la variedad NA 56-79, en medio líquido con puente de papel filtro y utilizó ápices de 2-3 mm. de largo. En 1986, Lee comparó los medios: sólido y líquido con puente de papel filtro utilizando la variedad NA 56-79, concluyendo que da mejores resultados el medio líquido con puente de papel filtro (4,6,7,8,10,13). Sin embargo Moreno (1991) comparó los medios: sólido, líquido con puente de papel filtro y líquido sin puente de papel filtro. Determinó que la caña de azúcar, a diferencia de otras plantas, puede crecer en medio líquido sin puente de papel filtro. También comparó carbón activado con ácido cítrico para eliminar la oxidación o sus efectos, dándole mejor resultado el ácido cítrico en medio líquido y el carbón activado en medio sólido (21).

3.4.3. Eliminación de Enfermedades

Cuando las plantas son propagadas vegetativamente y son infectadas con enfermedades virales, los patógenos pasan de una generación vegetativa a la siguiente. Esto puede evitarse por el cultivo de meristemas.

Esto se ha logrado porque los meristemas tienen la posibilidad de estar libres de virus o contienen bajas concentraciones de éstos. Cuando el meristemo no está libre de virus, le aplica a la planta quimioterapia o termoterapia, antes del cultivo de meristemas. El cultivo de meristemas



es la única técnica que ha dado plantas libres de virus y también sirve para obtener plantas libres de patógenos como micoplasma y bacterias. (3,4,5,6,13,17,19).

3.4.4. Eliminación de Enfermedades Virosas en caña de azúcar

Moreno (1991) utilizó ápices de 1 a 2 mm para eliminar los virus y comparó los tratamientos de: termoterapia y agua caliente con el testigo. El mejor método fue el del agua caliente con 88% de ápices libres de virus (21).

3.5. Factores que Influyen en el Éxito del Cultivo de Meristemos

Los principales factores que afectan el éxito del cultivo de meristemos son los siguientes:

- a) **Tamaño del explante:** a mayor tamaño, mayor probabilidad de éxito. Para producir plantas libres de virus se usa frecuentemente ápices de 0.5 a 2.0 mm., aunque, según la especie se pueden usar explantes de mayor tamaño. Vine y Jones (1969) obtuvieron plantas de lúpulo libres de virus utilizando ápices de 5mm.
- b) **Localización del meristemo:** los meristemos apicales producen más brotes laterales. En caña de azúcar se ha observado que producen menos compuestos fenólicos y hay menos contaminación.
- c) **Epoca del año:** la mejor época para obtener el explante es la de mayor crecimiento, por las hormonas que hay en el tejido y hay menor concentración de virus.
- d) **Disección:** luz fría, escalpelos bien afilados para reducir la oxidación.
- e) **Medio de cultivo:** macro y micronutrientes, fuente de carbono, reguladores del crecimiento, vitaminas y medio (sólido o líquido).
- f) **Luz :** fotoperíodo, intensidad y tipo de luz (según la especie).
- g) **Temperatura:** según la especie
- h) **Estado fisiológico:** plantas sanas y en etapa de máximo crecimiento.

i) Oxidación de compuestos polifenólicos: Muchas plantas son ricas en compuestos polifenólicos y dan problemas en el establecimiento de cultivo de tejidos como: café, especies forestales, banano, caña de azúcar, etc. Después de herir el tejido durante la disección, tales compuestos son oxidados y transformados en quinonas por la enzima polifenoloxidasas, y los tejidos y el medio se vuelven marrón o negros. Es sabido que los productos de dicha oxidación inhiben el crecimiento celular y la actividad enzimática de los explantes provocando así su muerte. Los productos de la oxidación de los compuestos polifenólicos normalmente son usados por las plantas para combatir infecciones virales, fungosas o bacteriales ya que estos compuestos atacan las proteínas (4,23).

En caña de azúcar se ha observado que hay diferencia varietal en cuanto a la oxidación de compuestos polifenólicos (24). Algunos de los procedimientos usados para combatir el problema de los fenoles son: **a)** adición de antioxidantes al medio de cultivo; **b)** sumergir los explantes en una solución antioxidante antes de inocularlo en el medio de cultivo; **c)** usar un período inicial de incubación con poca luz u oscuridad durante varios días (3,15,18,19,20). **d)** En algunos casos se ha probado que el medio líquido es mejor para combatir la oxidación, ya que en medio sólido los antioxidantes o inhibidores de la polifenoloxidasas no funcionan o lo hacen poco. Se han reportado los siguientes inhibidores de la polifenoloxidasas, utilizados en cultivo de tejidos: ácido ascórbico, cianuro de potasio, tiourea, cisteína. También se han reportado los siguientes antioxidantes utilizados en cultivo de tejidos: ditiotreitól, cisteína, ácido ascórbico, mercaptoetanol, dietiltiocarbamato y ácido cítrico. Además se reportan dos sustancias en cultivo de tejidos que no son ni antioxidantes ni inhibidoras de la polifenoloxidasas, pero se adhieren a ellas y a los productos de dicha oxidación, evitando así sus efectos tóxicos, la polivinilpirrolidona y el carbón activado.(4,10,12,18,19,) Se ha reportado que la cisteína y la polivinilpirrolidona no redujeron la

actividad de la polifenoloxidasas. (12)

4. JUSTIFICACIONES

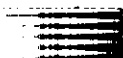
La caña de azúcar (Saccharum sp.) es de gran importancia para Guatemala por sus productos principales que son: el azúcar, el bagazo (utilizado principalmente en la cogeneración de energía eléctrica y -en forma secundaria- como alimento para ganado y en la producción de cartón) y la melaza (de ésta se extrae principalmente alcohol etílico y ron). Además, la agroindustria de la caña de azúcar también es una importante fuente de empleo y divisas, estimándose que durante la temporada 1988/1989 generó ocupación temporal para por lo menos 81,000 trabajadores e ingreso de divisas por concepto de exportación de azúcar en el año 1990 fue de 127.05 millones de dólares.

Actualmente, en Guatemala, la reproducción de la caña de azúcar en plantaciones comerciales se hace exclusivamente por medio de material vegetativo, necesitándose varios años para obtener suficiente material de un clon con fines comerciales. En contraste con el método tradicional, la micropropagación puede generar en pocos meses, mayor cantidad de individuos (26).

La propagación in vitro por medio del cultivo de tejidos vegetales, presenta las siguientes ventajas:

- a) Obtención de plantas libres de virus, bacterias y hongos a partir de plantas infectadas.
- b) Propagación acelerada: La tasa de multiplicación de la caña de azúcar es baja (1:10 en ciclo de 7 meses) y la micropropagación de caña de azúcar a partir de ápices puede producir mayor cantidad de plantas en menos tiempo que el método tradicional. Por este método sería factible producir 20,000 plantas en 6 meses. En banano se ha obtenido en un año un millón de clones a partir de una sola planta.
- c) Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año, mientras que los métodos convencionales dependen de épocas propicias.

- d) Facilita el intercambio de material genético sin complicaciones cuarentenarias.**
- e) Es de gran utilidad en mejoramiento genético, ya que un serio problema presentado en los programas de mejoramiento de caña de azúcar, utilizando los medios convencionales, es la dificultad de multiplicar el material seleccionado con rapidez.**
- f) Cada una de las plantas obtenidas a partir de meristemos es fiel a tipo, es decir que se obtienen plantas genéticamente idénticas. En síntesis, en caña de azúcar se necesita un período de 10 a 15 años para obtener una variedad. El cultivo de meristemos reduce el tiempo de multiplicación y aumenta la tasa de multiplicación. Se ahorra tiempo al tener a disponibilidad más material en menor tiempo para su evaluación. Este tiempo, puede significar ganancias económicas ya que la nueva variedad podría estar produciendo en mucho menor tiempo.**
- g) Ahorro y ganancia de espacio: En espacio reducido es posible mantener cantidades considerables de clones que servirán como semilla en el campo. Permite hacer uso del área vertical, utilizando varios niveles.**
- g) Puede utilizarse para estudios fisiológicos.**
- h) El medio líquido tiene las ventajas de ser más económico y ayuda a reducir la oxidación.**



5.0. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Corroborar la propagación in vitro de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) a partir de meristemos, en medio líquido.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Utilizar el medio Murashige-Skoog modificado y líquido para la propagación in vitro de caña de azúcar a partir de meristemos.

Controlar la oxidación de los explantes utilizados en la micropropagación de caña de azúcar, añadiendo agentes químicos al medio de cultivo.

Propagar tres variedades de caña de azúcar con diferente capacidad (baja, media y alta) para producir brotes laterales.

6. HIPOTESIS

6.1. La L- cisteína es mejor que el ácido cítrico para evitar los efectos de la oxidación de compuestos fenólicos.

6.2. No hay diferencia significativa entre la respuesta a la propagación in vitro de las tres variedades de caña de azúcar utilizadas en el presente estudio.

6.3. El medio Murashige-Skoog modificado y líquido es efectivo para la propagación in vitro de caña de azúcar

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo del Trabajo:

7.1.1. Medios:

7.1.2. Recursos Humanos:

Julio Arribas Menes, Estudiante de Biología de la Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia e Ing.
Agr. Ph.D. Gregorio Soto G. del Director del Programa de Variedades de CENGICAÑA

7.1.3. Recursos Materiales:

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Dirección General de Energía Nuclear del
Ministerio de Energía y Minas

7.2. Materiales:

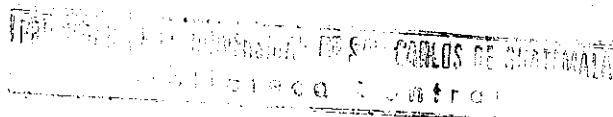
7.2.1. Material de Estudio:

Las siguientes variedades de caña de azúcar Saccharum sp.: Mex 68P23, CP-721210 y Ja
6419, proporcionadas por CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación en
Caña de Azúcar) obtenidas en Escuintla.

Los antioxidantes L-cisteína y ácido cítrico y el medio de cultivo MS modificado y líquido.

7.2.2. Equipo:

- Campana de flujo laminar.
- Estereoscopio.
- Balanza analítica.
- Agitador magnético.
- Potenciómetro.
- Autoclave.



- Balón de Palais.
- Embudo.
- Piseta.
- Varilla de vidrio.
- Pipetas de 1.0, 5.0 y 10.0 cc.
- Erlenmeyers de 250, 500 y 1,000 cc.
- Beakers de 25, 50, 250, 500 y 1,000 cc.
- Cajas Petri
- Tubos para cultivo de tejidos.
- Magentas.
- Pinzas.
- Bisturí.
- Mechero de alcohol.
- Incubadora con luz y temperatura controladas.
- Papel aluminio.

7.3.3. Reactivos:

- Tween 20.
- Hipoclorito de sodio.
- Etanol al 70 y 95%.
- Agua desmineralizada y tridestilada.
- Nitrato de amonio.
- Nitrato de potasio.

- Cloruro de calcio dihidratado.
- Sulfato de magnesio hepta hidratado.
- Acido bórico.
- Fosfato de potasio.
- Sulfato de manganeso tetra hidratado.
- Sulfato de zinc hepta hidratado.
- Yoduro de potasio.
- Molibdato de sodio dihidratado.
- Sulfato de cobre penta hidratado.
- Cloruro de cobalto hexa hidratado.
- Sulfato de hierro hepta hidratado.
- Na-EDTA.
- Tiamina-HCl.
- Mioinositol.
- Sacarosa.
- Acido naftalenacético.
- Acido indolacético.
- Acido giberélico.
- Kinetina.

7.3.0 Procedimiento:

7.3.1 Explicación general del presente estudio:

Se multiplicaron in vitro las siguientes variedades de caña de azúcar, que son cultivadas en



Guatemala: Mex 68P23 (11.52% del total de caña cultivado en Guatemala), ésta presenta ahijamiento alto; la variedad CP 721210 presenta ahijamiento medio (9.58% del total cultivado en Guatemala) y Ja 6419 presenta ahijamiento bajo (no es cultivada comercialmente en Guatemala) (2).

Se usó el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) modificado que contiene macro y micronutrientes, vitaminas, fuente de carbono y reguladores del crecimiento. Se comparó el efecto de dos antioxidantes: ácido cítrico a una concentración de 150 mg/l (utilizado por CENICAÑA en Colombia) y L-cisteína en una concentración de 50 mg./l (utilizado por la Facultad de Agronomía de la U.S.A.C., para la propagación in vitro de caña de azúcar en medio sólido) (26) .

Los tamaños de ápices utilizados fueron: 1 mm, 3 mm y 5 mm aproximadamente y se sembraron 432 ápices (16 por tamaño de ápice, por variedad y por antioxidante).

7.3.2. METODOLOGIA PARA LA PROPAGACION IN VITRO DE CAÑA DE AZUCAR A PARTIR DE APICES

7.3.2.1. Preparación de Soluciones Madre:

Se prepararon soluciones concentradas, de macro y micronutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento, de las cuales se tomaron pequeñas alícuotas para preparar el medio de cultivo. (ver anexo)

7.3.2.2. Preparación de Medios de Cultivo:

Se prepararon los medios de cultivo un día antes de la siembra. Se usó el medio Murashige Skoog modificado y líquido (ver anexo). A un grupo se le añadió ácido cítrico y al otro L-cisteína como antioxidantes.

7.3.2.3. Desinfección:

Se lavaron los explantes con una mezcla de detergente, antibiótico y agua durante 20

minutos. Posteriormente se sumergieron en alcohol al 95% por dos segundos y se lavaron con agua estéril. Después se sumergieron en hipoclorito de sodio a una concentración de 5 g. en 150 cc. de agua destilada estéril durante 5 o 6 minutos, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y finalmente se llevaron a la cámara de transferencia.

7.3.2.4. Siembra

Se tomaron los ápices y se pasaron al medio de iniciación MS I en tubos de ensayo (1 ápice en cada tubo de ensayo con 10 cc. de medio), luego se colocaron en la cámara de incubación durante 10 días, totalmente cubiertos con papel aluminio, a una temperatura de 24 a 25 °C. Después de los 10 días en oscuridad se descubrieron y estuvieron 30 días a la misma temperatura, con luz fluorescente controlada y fotoperíodo 12-12. Después de estar en el medio de iniciación, las plantas que sobrevivieron se pasaron al medio de multiplicación MS II, donde estuvieron 28 días para el desarrollo de yemas laterales.

7.3.3. Tratamientos por Variedad:

Acido cítrico y 3 tamaños de ápice de cada variedad.

L-cisteína y 3 tamaños de ápice de cada variedad.

7.4. Diseño Estadístico

Prueba de proporciones. (27,28)

8. RESULTADOS

En el medio de iniciación MS I con el antioxidante L-cisteína a una concentración de 50 mg/l no se evitó la oxidación en ninguno de los tubos de ensayo con ápices sembrados de los tres tamaños y de las tres variedades. El medio se puso color café e incluso se formó precipitado de los compuestos fenólicos oxidados. Debido a la oxidación, todos los ápices murieron. (Cuadros 1,2 y 3)

Al duplicar la concentración del antioxidante L-cisteína, en el medio MS I a 100 mg/l , tampoco se evitó la oxidación. Todos los ápices de los tres tamaños, de las tres variedades estudiadas murieron y nuevamente la supervivencia fue de 0% (Cuadros 4,5,6)

En el medio MS I con 150 mg/l de ácido cítrico se redujo la oxidación y el medio no adquirió el color café en los tubos de ensayo con ápices. Se obtuvieron tasas de supervivencia desde un 18.75% hasta un 100% (Cuadros 7, 8 y 9).

Estos resultados muestran la diferencia entre ácido cítrico y L-cisteína como antioxidante. Con ácido cítrico en el medio MS I (150 mg/l) se obtuvieron distintos porcentajes de supervivencia según la variedad y el tamaño del ápice. Todos los ápices de 1 mm de las tres variedades murieron. (Ver cuadro 7). Con los ápices de 3 mm se observó que en las variedades Mex 68P23, CP 721210 y Ja 6419 los porcentajes de supervivencia fueron de 18.75, 62 y 100, respectivamente, y el tamaño alcanzado por las plántulas fue de alrededor de 3 cm (Cuadro 8). Con los ápices de 5 mm se obtuvieron resultados similares, ya que los porcentajes de supervivencia fueron: 18.75, 75 y 100%

Resultados del cultivo de ápices de caña de azúcar de 1, 3 Y 5 mm en el medio de iniciación

MS I con 50 mg/l de L-cisteína como antioxidante.

Cuadro 1.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 1mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	NO	16	0
MEX 68 P 23	NO	16	0
JA 6419	NO	16	0

Cuadro 2.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 3 mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	NO	16	0
MEX 68 P 23	NO	16	0
JA 6419	NO	16	0

Cuadro 3.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 5 mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	NO	16	0
MEX 68 P 23	NO	16	0
JA 6419	NO	16	0

Resultados del cultivo de ápices de 1, 3 y 5 mm en el medio de iniciación MS I con 100 mg/l de L-cisteína como antioxidante.

Cuadro 4.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 1 mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	NO	16	0
MEX 68 P 23	NO	16	0
JA 6419	NO	16	0

Cuadro 5.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 3 mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	NO	16	0
MEX 68 P 23	NO	16	0
JA 6419	NO	16	0

Cuadro 6.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 5 mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	NO	16	0
MEX 68 P 23	NO	16	0
JA 6419	NO	16	0

Resultados del cultivo de ápices de 1 mm en el medio de iniciación MS I con 150 mg/l de ácido cítrico como antioxidante.

Cuadro 7.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 1mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	SI	16	0
MEX 68 P 23	SI	16	0
JA 6419	SI	16	0

Cuadro 8.

VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 3mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	SI	16	62.5
MEX 68 P 23	SI	16	18.75
JA 6419	SI	16	100.0

Cuadro 9.

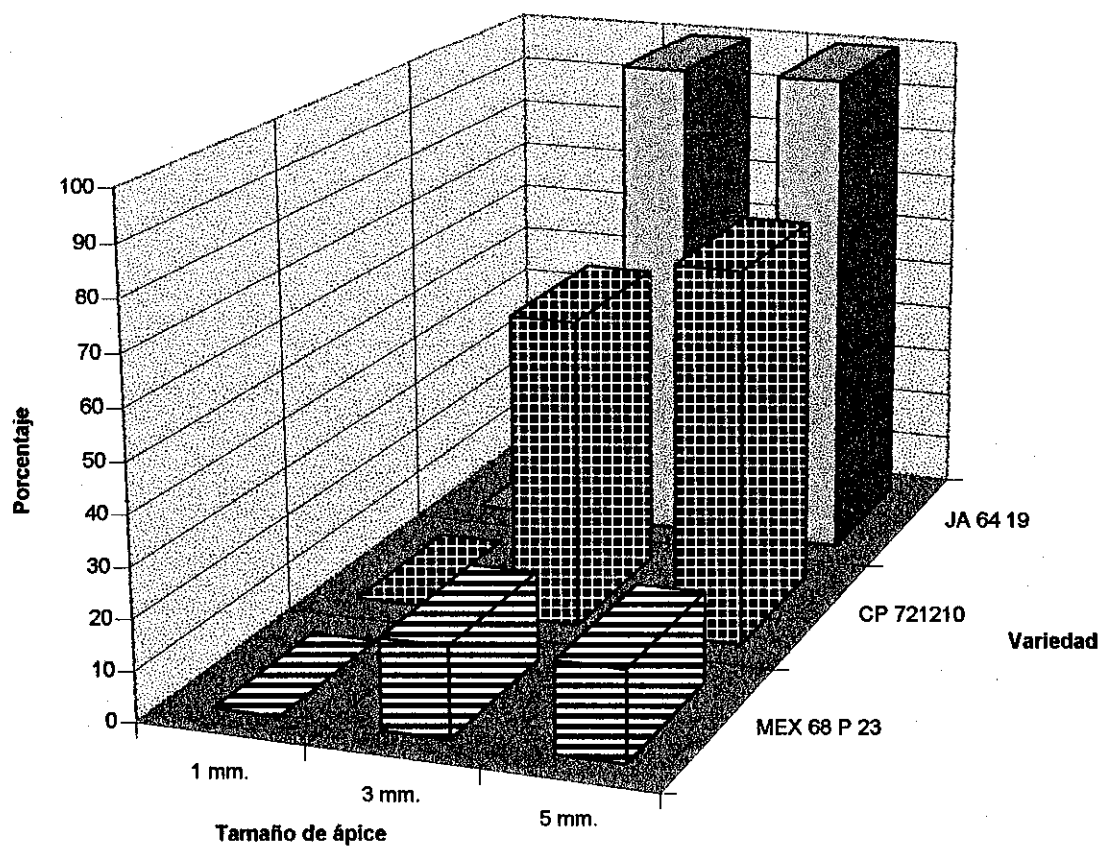
VARIEDAD DE CAÑA DE AZUCAR	PRESENCIA DEL EFECTO ANTIOXIDANTE	No. DE CULTIVOS DE 5 mm	% DE SUPERVIVENCIA
CP 721210	SI	16	75.0
MEX 68 P 23	SI	16	18.75
JA 6419	SI	16	100.0

Total de apices de 1, 3 y 5 mm que sobrevivieron con 150 mg./l de ácido cítrico.

Cuadro 10.

VARIEDAD	1 mm.	3 mm.	5 mm.	TOTAL	% SUPERVIVENCIA
CP 721210	0	10	12	22	48
MEX 68 P 23	0	3	3	6	12.5
JA 6419	0	16	16	32	66
TOTAL	0	29	31	60	41.6
% SUPERVIV.	0	60.4	64.6	41.6	

**Porcentaje de Plantulas Sobrevivientes en el Medio MS I con 150 mg. /
lt. de ácido cítrico como antioxidante**



9. DISCUSION

Los resultados indican que la L-cisteína a concentraciones de 50 y 100 mg. por litro no evita la oxidación de los compuestos fenólicos de la caña de azúcar. En todos los tubos de ensayo se observó que el medio cambió de transparente a una coloración café, debido a los compuestos fenólicos oxidados; éstos al oxidarse se transforman en quinonas, las cuales forman polímeros que dan el característico color café de los tejidos dañados de los vegetales (23). La muerte de los explantes seguramente fue causada porque los productos de la oxidación fenólica reaccionan con aminoácidos y proteínas inhibiendo la actividad enzimática (4,23).

Los reportes sobre el ácido cítrico como un efectivo antioxidante, sí concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio (2, 18). La muerte de todos los ápices de 1mm se ha observado también en experimentos realizados en Brasil como lo indica Soto (1995) (2). Esto confirma que este tamaño de explante no es adecuado para lograr la micropropagación *in vitro* de caña de azúcar.

De las tres variedades, la que presentó menos sobrevivencia fue la Mex 68P23. Para ésta se reportó mayor oxidación mientras se hacían los cortes, esto concuerda con que la variedad es resistente a mayor número de enfermedades. (4,11,23) La variedad Ja 6419 fue la que presentó mayor sobrevivencia y la que menos oxidación presentó al hacer los cortes, en algunos de los ápices no se notó líquido café al hacer el corte. También esto coincide con que esta variedad tiene niveles de tolerancia a ciertas enfermedades más bajos en relación a MEX 68P23 (4,11,23).

Se debe continuar haciendo investigaciones relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar, ya que este cultivo es de gran importancia económica para Guatemala, los avances en este campo ayudarán a aumentar la producción de este cultivo y podrían aplicarse a la propagación in vitro de otras plantas de importancia económica y de especies en peligro de extinción.

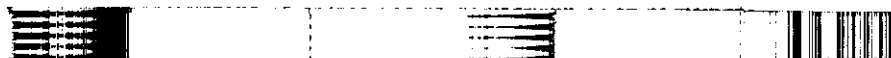
10. CONCLUSIONES

1. El ácido cítrico a una concentración de 150 mg/l es efectivo para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos de caña de azúcar durante la propagación in vitro de las tres variedades y los tres tamaños de ápice estudiadas .
2. La L-cisteína a concentraciones de 50 y 100 mg/l no es efectiva para evitar la oxidación en la propagación in vitro de caña de azúcar en ninguno de los tres tamaños de ápice utilizados de las tres variedades utilizadas en este estudio.
3. Los ápices de 1 mm. no se deben usar con la metodología aplicada en este estudio para la propagación in vitro de caña de azúcar, ya que ninguno de estos se desarrolló.
4. Esta metodología fue efectiva para permitir el crecimiento y desarrollo de los ápices de 3 y 5 mm.
5. Hay diferencia varietal en la capacidad de sobrevivencia durante la propagación in vitro, ya que hubo diferencia significativa entre las proporciones de sobrevivientes de las tres variedades. La mayor sobrevivencia se obtuvo en la variedad Ja 6419 y la menor, en la variedad Mex 68P23.

11. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos, se recomienda:

- a. Modificar la metodología reduciendo el tiempo de permanencia de los ápices en el medio MS I, ya que las hojas de las plántulas se comenzaron a marchitar pocos días antes de su trasplante al medio MS II.
- b. Utilizar ápices de 3 o 5 mm. Con ambos se obtiene un buen crecimiento y desarrollo, sin embargo los de 5 mm. alcanzan mayor longitud en menos tiempo y es más fácil obtenerlos de la planta madre.
- c. Utilizar cloruro de calcio y dióxido de carbono para evitar la pérdida de nucleótidos y potasio que se dan paralelos a la oxidación. (12)
- d. Utilizar incinerador eléctrico en vez de mechero, ya que al flamear la boca de los tubos de ensayo se introduce etileno y hay plantas extrasensibles a éste. (12)



12. BIBLIOGRAFIA

1. Perez, M.A. 1993 Las exportaciones de Azúcar Guatemalteco en el Mercado Mundial: Tendencias 1961-1988 y perspectivas. Guatemala: USAC. (Tesis de graduación, Facultad de Agonomía). 88 pp.
2. Soto, G.J. 1994. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación en Caña de Azúcar. Conversación personal
3. Cadmo, H.R., Villalobos, V.M. 1990 Fundamentos Teórico Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Italia F.A.O. 112 pp.
4. Evans, D.A. et al. 1983. Handbook of Plant Cell Culture techniques for propagation and breeding. U.S.A. Ed. MacMillan Co. 5 Vols.
5. Hurtado, D.V. y Merino, M.E. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Mexico: Trillas. 232 pp.
6. Roca, R.G. y Mroginski, L.A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia, 969 pp.
7. Lee, T.S.G. 1984. Micropropagação de cana-de açúcar através de cultura de meristema apical. Brasil Saccharum Brasil 7(35): 36-39.
8. Lee, T.S.G. 1986. Multiplication of Sugar Cane by Apex Culture. Turrialba 36.(2): 231 - 236.
9. Sauvaire, D. Galzy, R. 1981. Micro-propagation de la cane à sucre par Bouturage "in vitro" Action d'une Auxine et d'une cytokynine Agronomie Tropicale France 36(1) 63-69.
10. Liu, M.C. 1971 A new method for sugarcane breeding: tissue culture technique. Taiwan. Taiwan Sugar. 18(1):8-10
11. CENGICAÑA, 1995. (Programa variedades). Caracterización y Colección Nacional de Germoplasma. Guatemala
12. Bonga, J.M. Durzan, D.J. 1982. Tissue Culture in Forestry. Holland: Martinus Nijhoff, 420 p.
13. Carlson, J. 1986. Assenbly Line Plants Take Root. Agricultural Research. U.S.A. 28(4):16-22
14. Crocomo, J. et al. 1991. Biotecnología para Produção Vegetal. Centro de Biotecnología. Agricola. Brasil pp. 539.
15. Dodds, H. 1983. Tissue Culture of Trees. U.S.A. Ed. Avi. 147 pp.

16. Heinz, D.J. et al. 1987. Cell, Tissue and Organ Culture in Sugarcane Improvement. *Saccharum* U.S.A. 20:11-20.
17. Smith, P. 1989. Biotechnology and Plant Breeding. *Agricultural Biotechnology News and Information*. U.S.A. 19 1: 27 - 32.
18. Flores, D.M. Besthouly, M. 1989. Establecimiento del cultivo "in vitro" de ápices de café XII Simposium de Caficultura. Guatemala. 40 - 49
19. Moreno, B. 1991 Limpieza "In Vitro" de Caña de Azucar. U. Nac. de Colombia Fac. de C.C. Agrop. Palmira, Colombia 46 pp
20. CENICAÑA, 1990. Manual de Laboratorio del Centro de Investigaciones de Caña de Azucar. Colombia. CENICAÑA, 45 PP.
21. Florence, C.R. Et al. 1991. Cysteine as an Inhibitor of Enzymatic Browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. U.S.A. 39, 841-847 pp.
22. Ikediobi, C.O. Obasuyi, H. 1982. Purification and some Properties of Polyphenol Oxydase from White Yam tubers. *Phytochemistry* U.S.A. 21(12): 2815 - 2820.
23. Stumpff, P.K. Conn, E.E. 1981. *The Biochemistry of Plants a Comprehensive Traetise*. U.S.A. Academic Press. 2: 798 PP.
24. Buchelli, C.S. Robinson, S.P. 1994. Contribution of Enzymic Browning to Color in Sugarcane Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. U.S.A. (42) 257 - 261
25. Cervelli, R. 1987. "In vitro" Propagation of Aconitum noveboracense and A napelus. *Hort Science*, Vol 22(2). U.S.A.
26. Arévalo, A. 1994. Departamento de Cultivo de Tejidos, Area Tecnológica, Facultad de Agronomía, U.S.A.C. Conversación personal.
27. Hernandez, J.F. 1995. Instituto de investigaciones Químicas y Biológicas, Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia U.S.A.C. Conversación personal
28. Cruz, N. 1995 I.I.M.E. Universidad de San Carlos de Guatemala. Conversación personal

13. ANEXOS



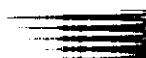
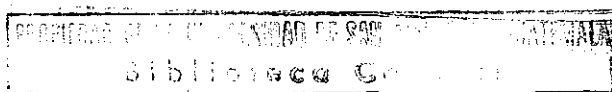
ANEXO 1

SOLUCIONES MADRES PARA PREPARAR MEDIO BASAL EN CULTIVO IN VITRO DE CAÑA DE AZUCAR

Soluc. No.	Constituyentes	Soluc. Madre (mg)	Concentrac. final (mg/l)	Volumen sol. Madre por litro y medio
1	NH ₄ NO ₃	165000	1650	20 ml
	KNO ₃	190000	1900	
	MgSO ₄ 7H ₂ O	37000	370	
	KH ₂ PO ₄	17000	170	
	H ₂ O	2 000 ml		
2	H ₃ BO ₃	620	6.2	1 ml
	MnSO ₄	1690	22.3	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	860	8.6	
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	25	0.25	
	CuSO ₄ 5H ₂ O	2.5	0.025	
	CoCl ₂ 6H ₂ O	2.5	0.025	
	H ₂ O	100 ml		
3	KI	83	0.83	1 ml
	H ₂ O	100 ml		
4	CaCl ₂	33223	332.23	5 ml
	H ₂ O	500 ml		
5	Na ₂ EDTA	3730	37.3	5 ml
	FeSO ₄ 7H ₂ O	2780	27.8	
	H ₂ O	500 ml		
6	TIAMINA-HCl	100	1	1 ml
	H ₂ O	100 ml		

NOTA:

Soluciones Madres 2 y 6 guardar congeladas; las demás refrigeradas. Solución 5, envasar en frasco oscuro. Solución 6 usar en 1-2 meses; las demás hasta 4-5 meses. Si se tienen las sales de Murashige se pueden reemplazar las soluciones 1,2,3,4 y 5 por 4.3 gr/l de estas sales.



**MEDIOS PARA CULTIVOS DE MERISTEMOS (MS I):
MULTIPLICACION (MS II); ENRAIZAMIENTO (MS III)**

Solución madre	MS I	MS II	MS III
	----	----	-----
	1 lt.	4 lts.	4 lts.
1	20 ml	80 ml	80 ml
2	1	4	4
3	1	4	4
4	5	20	20
5	5	20	20
6	1	4	4
o sales Murashige (SIGMA M 5524)	4.3 g	17.2 g	17.2 g
Sol. 6 (Tiamina)	1 ml	4 ml	4 ml
Inositol	100 mg	400 mg	400 mg
Kinetina	-	4 ml	4 ml
BAP	-	4 ml	4 ml
IBA	1 ml	-	-
GA ₃	1 ml	-	-
ANA	-	-	4 ml
Acido cítrico	150 mg	600 mg	-
Sacarosa	20 g	80 g	80 g

Kinetina = 10 mg/100 ml (disolver en 2-3 ml de NaOH 1N) congelar.

BAP (6 bencilaminopurina) = 3mg/100ml (2-3 ml de NaOH 1N) refrigerar.

IBA (Acido indolbutírico)= 1 mg/100 ml (2-3 ml NaOH 1N) congelar

GA₃ (Acido giberélico) = 10 mg/100 ml (en 2-3 ml ETOH) refrigerar

ANA (Acido naftalenacético)= 500 mg/100 ml (2-3 ml NaOH 1N)

NOTA: Todas las soluciones madre se agregan al medio basal de las sales en el volumen que se indica y se cuadra pH a 5.8 con NaOH 1N o HCl 1N. Se coloca el medio en autoclave a 15 lbs. de presión por 15 minutos, en los recipientes en donde se vayan a sembrar los meristemas (MS I) o las plántulas (MS II o MS III).

ANEXO 2

**PRUEBA DE PROPORCIONES PARA DATOS NO PARAMETRICOS
COMPARACION DE PROPORCIONES DE APICES SOBREVIVIENTES DE LAS TRES
VARIEDADES DE CAÑA DE AZUCAR.**

Prueba 1. Variedad CP-721210

	VIVOS	MUERTOS	TOTAL	PROP. VIVOS	PROP. MUERTOS
tamaño (3 mm)	10	6	16	0.625 p	0.375 q
tamaño (5 mm)	12	4	16	0.750 p	0.25 q
TOTAL	22	10	32	0.6875 p	0.3125 q

$$Z = \frac{0.625 - 0.750}{\sqrt{\frac{(0.6875)(0.3125)}{16} + \frac{(0.6875)(0.3125)}{16}}}$$

$$Z = 0.7631$$

Z calc < Z esp = no hay diferencia significativa

Prueba 2. Comparación de los ápices de 3 mm. las variedades CP-721210 y MEX 68 P 23.

	VIVOS	MUERTOS	TOTAL	PROP. VIVOS	PROP. MUERTOS
CP-721210 (3 mm)	10	6	16	0.625 p	0.375 q
MEX 68 P 23 (3 mm)	3	13	16	0.1875 P	0.8125 q
TOTAL	13	19	32	0.4063 p	0.5938 q

$$Z = \frac{0.625 - 0.1875}{\frac{(0.406)(0.594) + (0.406)(0.594)}{16 + 16}}$$

$$Z = 2.52 \quad \text{tabulado} = 1.6973$$

Hay diferencia significativa entre los ápices de 3 mm. de la variedad MEX y los ápices de 3 mm. de la variedad CP - 721210 y obviamente entre los ápices de esos tamaños en las variedades MEX 68 p 23 (3 vivos) y JA 6419 (16 vivos).

Prueba 3. Comparación de los ápices de 3 mm. de las variedades CP-711210 y JA 6419

	VIVOS	MUERTOS	TOTAL	PROP. VIVOS	PROP. MUERTOS
CP-721210 (3 mm)	10	6	16	0.625 p	0.375 q
JA 6419 (3 mm)	16	0	16	1.000 P	0 q
TOTAL	26	6	32	0.8125 p	0.1875 q

$$Z = \frac{1.000 - 0.625}{\frac{(0.8125)(0.1875) + (0.8125)(0.1875)}{16 + 16}}$$

$$Z = 2.72 \quad \text{tabulado} = 1.6973$$

Hay diferencia significativa entre los ápices de 3 mm. de la variedad JA y los ápices de 3 mm. de la variedad CP - 721210.

Prueba 4. Comparación de los ápices sobrevivientes de 5 mm. de las variedades CP -721210 Y JA 6419.

	VIVOS	MUERTOS	TOTAL	PROP. VIVOS	PROP. MUERTOS
CP-721210 (5 mm)	12	4	16	0.750 p	0.250 q
JA (5 mm)	16	0	16	1.000 p	0 q
TOTAL	28	4	32	0.875 p	0.125 q

$$Z = \frac{1.000 - 0.750}{\frac{(0.875)(0.125) + (0.875)(0.125)}{16}}$$

$$Z = 2.13 \quad \text{tabulado} = 1.6973$$

Hay diferencia significativa entre la proporción de sobrevivientes de los ápices de la variedad MEX 68 P 23 (3 vivos) y la variedad CP-721210 (12 vivos) y obviamente entre los ápices de la variedad MEX 68 P 23 (3 vivos) y los de la variedad JA 6419 (16 vivos). También hay diferencia significativa entre los ápices de la variedad CP-721210 (12 vivos) y los ápices de la variedad JA 6419 (16 vivos).

Prueba 5. Comparación del total de ápices vivos y muertos de 3 y 5 mm., de las tres variedades.

	VIVOS	MUERTOS	TOTAL	PROP. VIVOS	PROP. MUERTOS
TRATADOS (3 mm)	29	19	48	0.6092 p	0.3958 q
TRATADOS (5 mm)	31	17	48	0.6458 p	0.3542 q
TOTAL	60	36	96	0.625 p	0.375 q

$$Z = \frac{0.6042 - 0.6458}{\frac{(0.625)(0.375)^2}{16}}$$

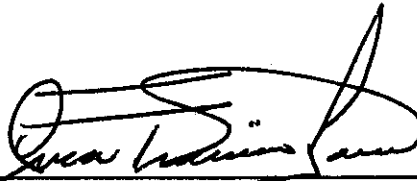
$$Z = 2.28 \quad \text{tabulado} = 1.6973$$



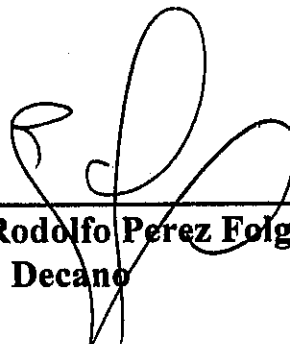
Br. Julio Arribas Menes
Autor



Ph D. Gregorio J. Soto Guevara
Asesor



MSc. Oscar F. Lara
Director



Lic. Jorge Rodolfo Perez Folgar
Decano