

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
PROGRAMA RECURSOS GENETICOS NICARAGÜENSES



TRABAJO DE TESIS

**MICROPROPAGACION DE DOS CLONES
DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum* sp.) ISA 96-110 E ISA 96-111**

AUTORAS

Br. Ruth Hernández Díaz
Br. Carmen Marina Rugama Reyes

ASESORES

Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro
Ing. Agr. Marbell Aguilar Maradiaga

Managua, Nicaragua
Noviembre, 1998

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	4
2.1 Localización del experimento	4
2.2 Esterilización de materiales y equipo	4
2.3 Preparación de los medios de cultivo	5
2.4 Fase de establecimiento	6
2.4.1 Selección del material vegetativo	6
2.4.2 Preparación del material vegetativo	6
2.4.3 Desinfección del material vegetativo	6
2.4.4 Siembra del material vegetativo	7
2.4.5 Medio de cultivo en la fase de establecimiento	7
2.4.6 Análisis de los datos	8
2.4.7 Variables evaluadas	8
2.5 Fase de multiplicación	9
2.5.1 Medios de cultivo en la fase de multiplicación	9
2.5.2 Diseño estadístico	10
2.5.3 Variables evaluadas	10

2.6 Fase de enraizamiento	11
2.6.1 Medios de cultivo en la fase de enraizamiento	11
2.6.2 Diseño estadístico	12
2.6.3 Variables evaluadas	12
2.7 Aclimatación de las vitroplantas	13
2.7.1 Diseño experimental	14
2.7.2 Variables evaluadas	14
III. RESULTADOS Y DISCUSION	15
3.1 Fase de establecimiento	15
3.2 Fase de multiplicación	19
3.2.1 Altura de planta. Primer, segundo y tercer subcultivo	22
3.2.2 Promedio de brotes. Primer, segundo y tercer subcultivo	22
3.2.3 Número de hojas. Primer, segundo y tercer subcultivo	25
3.3 Fase de enraizamiento	27
3.4 Fase de aclimatación	30
IV. CONCLUSIONES	33
V. RECOMENDACIONES	34
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35
VII.- ANEXOS	38

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1	Constituyente del medio de cultivo básico propuesto por Murashige & Skoog MS (1962).	5
2	Variantes del medio básico MS (1962), utilizadas en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111.	8
3	Variantes del medio MS (1962), utilizadas en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111.	10
4	Variantes del medio MS (1962), utilizadas en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111.	12
5	Porcentaje de fenolización en la base de ápices caulinares y número de plantas con curvatura en caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, a los 25 días de establecidos.	16
6	Porcentaje de contaminación con bacterias y hongos y sobrevivencia de los explantes de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, establecidas en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962), a los 25 días.	18

- 7 Color de las hojas (porcentaje) de ápices caulinares de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, establecidas en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962), a los 25 días. 20
- 8 Promedio de altura (cm) en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962), durante el primero, segundo y tercer subcultivo. 22
- 9 Promedio de brotes en planta de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, desarrolladas en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962), durante el primer, segundo y tercer subcultivo. 23
- 10 Promedio de hojas las plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962), durante el primer, segundo y tercer subcultivo. 26
- 11 Porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, desarrolladas en 4 variantes del medio de cultivo MS (1962), a los 30 días. 28

12	Número y longitud promedio de raíces por plantas en caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, desarrolladas en 4 variantes del medio de cultivo MS (1962), a los 30 días.	29
13	Porcentaje de sobrevivencia y ahijamiento de las plantas de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, en la fase de aclimatación a los 30 días.	31
14	Promedio de brotes, altura de plantas y longitud de la última hoja de plantas de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, en la fase de aclimatación a los 30 días.	31

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1	Número de brotes por subcultivos obtenidos en la micropropagación de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962).	24

INDICE DE ANEXOS

<u>No.</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
Figura 2	Altura de planta (cm) por subcultivo obtenidos en la micropropagación de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111 en cuatro variantes de medios de cultivo MS (1962).	38
Figura 3	Número de hojas por subcultivo obtenidos en la micropropagación de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111 en cuatro variantes de medios de cultivo MS (1962).	39
Tabla 15	Promedio de altura (cm), número de brotes y número de hojas en plantas de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111 desarrolladas en 4 variantes de medios de cultivos durante 3 subcultivos.	40

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de desarrollar metodología para la micropropagación a partir de ápices caulinares, utilizando la técnica Spinder, y posteriormente aclimatación de las vitroplantas de dos clones de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) (ISA 96-110 e ISA 96-111). Se estudió el efecto que sobre el establecimiento tendrían 4 variantes del medio de cultivo MS (1962), suplidas con 0.0, 0.2 y 0.6 mg/l de 6-BAP. Se utilizaron 15 réplicas por tratamiento. Se evaluó el efecto que sobre la brotación tuvieron 4 variantes del medio MS (1962), a las que se les adicionó 0.0, 0.1 y 0.5 mg/l de 6 BAP durante tres subcultivos sucesivos. Se utilizaron 5 réplicas por variante en estudio. Para inducir el mayor enraizamiento se probaron 4 variantes líquidas del medio MS (1962), suplidas con 0.0, 1.0 y 1.6 mg/l de AIA. Para el estudio de aclimatación se emplearon 30 plantas por cultivar y se establecieron en un sustrato de lombrices Californiana (*Eisenia foetida*). El clon ISA 96-110 presentó mayor porcentaje de fenolización y menor curvatura que el clon ISA 96-111. El medio de cultivo MS + 0.60 mg/l de 6-BAP indujo al menor porcentaje de fenolización (33.0) y mayor de curvatura (60.0) en el clon ISA 96-110, el medio MS + 0.20 mg/l de 6-BAP en el clon ISA 96-111. La sobrevivencia de las plantas del clon ISA-111 fue de 100 % en todos los medios de cultivo, para el ISA 96-110 sólo los medios MS + 0.20 y MS + 0.00 mg/l de 6-BAP. No hubo aumento de los valores de las variables altura de planta, número de brotes y de hojas con el aumento del número de subcultivos. El medio de cultivo que indujo mayor brotación para el clon ISA 96-110 fue el MS + 0.30 mg/l, mientras que para el clon ISA 96-111 fue el MS + 0.1 mg/l de 6-BAP. El clon ISA 96-111 reportó resultados superiores en longitud (5.75 cm) y número de raíces (7.4) por planta. El medio de cultivo MS + 1.3 mg/l de AIA indujo los mejores resultados en ambos clones. El comportamiento de las plantas del clon ISA 96-111 fueron superiores a las del clon ISA 96-110 al momento de la aclimatación.

AGRADECIMIENTO

Nuestros sincero agradecimiento a los Ing. Agr. Marbell Aguilar Maradiaga e Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro, pilares fundamentales para la realización del presente estudio, por depositar en nosotras su confianza y compartir sus vastos conocimientos y experiencias sobre la técnica de cultivo de tejidos vegetales.

Al equipo del laboratorio de cultivo de tejidos, en especial a la Sra. Esmelda Bovadilla.

Al Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses por facilitarnos los materiales y equipos necesarios para la culminación de nuestro estudio, al Ing. Agr. Alvaro Benavidez González por brindarnos su ayuda incondicional en la realización de los análisis estadísticos.

A los docentes de la Universidad Nacional Agraria y a la Escuela de Producción Vegetal por contribuir en nuestra formación e inculcar en nosotras un espíritu de superación profesional.

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso, creador del universo, por darme la vida y permitirme haberle conocido e iluminado para culminar mis estudios universitarios.

A mis padres, Haydeé y Miguel, como un pequeño reconocimiento a su amor, paciencia, sacrificio y esperanza, la semilla que sembraron ha germinado en forma de esfuerzo, esmero y superación personal.

A mis hijos Katherinee y Rodney López Hernández que son la base de mis aspiraciones, y a mi esposo Noel por apoyarme y brindarme su confianza para que fuera lo que hoy soy.

A mis hermanos Claudia, Norma, Maria, José, Andrés, Moisés, Henry y Miguel (q.e.p.d.), que son un claro ejemplo para mi vida.

Ruth Hernández Díaz

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo de manera muy especial a Dios por ser mi guía, que me dió las fuerzas y la sabiduría necesaria para no desistir nunca del anhelo propuesto y permitir la culminación de mi carrera profesional.

A mi hija Grethell Millieth Carballo Rugama para que este esfuerzo sea luz para sus futuras aspiraciones.

A mis padres Pedro Pablo y Rosibel que depositaron cariño y confianza para mi formación profesional.

A mis hermanos Luis Emilio, Lesbia Esperanza, Mary y Karla Isolina.

Al padre de mi hija Ing. Agr. José Domingo Carballo Dávila

Carmen Marina Rugama Reyes

I.- INTRODUCCION

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum* tribu *Andropogonea* de la familia Gramineae. El género *Saccharum* tiene solo cinco especies, cuatro silvestres y una cultivada, *Saccharum officinarum* L. (Pérez, 1991). *Saccharum barber* (Jerw), *Saccharum spontaneum* L., especie muy polimorfa desde el punto de vista citológico, sistemático y ecológico. Tiene buena resistencia a muchas enfermedades y ha donado este carácter a muchas variedades comerciales, *Saccharum sinensis* (Roxb & Jeswiet) ocurre en estado silvestre y también como especie ecultivable, es muy estable genéticamente. *Saccharum robustum* (Brand & Jerw) es la especie ancestral de *Saccharum officinarum*. L., citológicamente es muy heterogénea y ha dado origen por cruzamiento a las variedades comerciales.

La teoría actual más comúnmente admitida, señala que *Saccharum robustum* , es la especie ancestral de la *Saccharum officinarum* L.y que su lugar de origen es Nueva Guinea y las islas vecinas (Fauconnier & Basse Reau, 1975).

En el ciclo 1997-1998 se produjeron 4.1 millones de toneladas cortas de caña y se procesaron 7.8 millones de quintales de azúcar (MAG, 1998).

El cultivo de la caña de azúcar ofrece grandes oportunidades a los países que, como Nicaragua tienen condiciones para el desarrollo del mismo; este cultivo ha sido catalogado por la UNESCO como el cultivo del futuro para emplearse como fuente de energía renovable. La caña de azúcar es uno de los rubros de mayor importancia económica en nuestro país debido a la gran diversidad de sus derivados, esta se utiliza principalmente para la obtención de azúcar y alcohol, y de los subproductos como el bagazo y la melaza se obtiene la celulosa y el ron, respectivamente; también se utiliza como planta forrajera, por lo tanto es una fuente de divisas (Blanco, 1986).

La propagación de la caña de azúcar según Pérez (1988) se puede realizar de tres formas: a) por yemas, b) por estacas y c) propagación *in vitro*.

En Nicaragua la propagación por medio de yemas no es utilizada de forma comercial por sus altos costos, la forma de propagación tradicional es mediante el uso de estacas aunque tiene algunas desventajas entre ellas: la pérdida del vigor a través del tiempo, la diseminación de plagas y enfermedades y un bajo coeficiente de multiplicación, esta problemática plantea la necesidad de implementar técnicas que permitan mejorar la calidad fitosanitaria del material de propagación así como la cantidad del material vegetativo.

Pérez (1987), reporta que el cultivo de la caña de azúcar en la micropropagación a través de meristemos se produce el rejuvenecimiento y las plantas aumentan en un 30 % el ahijamiento en la primera multiplicación y hasta un 20 % en la segunda. También las variedades que florecen en el primer ciclo no lo hacen, y en el segundo se presenta en un rango de 10 a 20 % en comparación con las plantas propagadas de forma convencional que florecen en un 100 %.

La micropropagación es una forma de propagación vegetativa empleando la técnica del cultivo de tejidos, desarrollándose bajo condiciones asépticas controladas, con ella se garantiza grandes volúmenes de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria (Sandoval, 1985; Arcas & Valverde, 1988).

González (1995), señala que la técnica de cultivo de tejidos mediante el uso de la micropropagación ofrece las siguientes ventajas:

- Multiplicación acelerada del número de plantas derivadas de una variedad de reciente introducción o nueva.
- Mayor control sobre la sanidad, obteniendo plantas libres de patógenos.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie pequeña y a bajos costos.
- Disminución de los volúmenes de semilla a transportar y por ende de los costos de producción.

Las respuestas de las especies al cultivo *in vitro* están en dependencia de la metodología utilizada, los factores físicos empleados (luz, temperatura, cristalería), el medio de cultivo (consistencia, reguladores de crecimiento) y la constitución genética de los cultivares empleados todos estos hacen posible el éxito de la técnica del cultivo de tejidos.

Como alternativa para superar los problemas en el cultivo de la caña de azúcar, anteriormente mencionados, la técnica de micropropagación ha sido considerada por muchos investigadores como posible solución para el saneamiento y aumentar los volúmenes de producción del material de siembra.

Con la realización del presente estudio se pretende cumplir con los siguientes objetivos.

1. Definir las variantes del medio básico, Murashige & Skoog (MS) (1962), más adecuada en la fase de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de los clones de caña de azúcar ISA 96-110 e ISA 96-111.
2. Evaluar el comportamiento de las vitroplantas de los clones de caña de azúcar (*Saccharum sp*) ISA 96-110 e ISA 96-111 en la fase de aclimatación de acuerdo a las respuestas morfológicas y porcentaje de sobrevivencia de las mismas.
3. Definir para cada clon de caña de azúcar (*Saccharum sp*) ISA 96-110 e ISA 96-111 la variante de medio de cultivo más adecuada en las distintas fases *in vitro* (establecimiento, multiplicación y enraizamiento).
4. Determinar la respuesta a la aclimatación de las vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum sp*), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, en base a sobrevivencia, ahijamiento, altura y número de hojas.

II.- MATERIALES Y METODOS

2.1. Localización del experimento

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), ubicado en el km 12 ½ Carretera Norte, Managua, Nicaragua, en el período comprendido entre Julio de 1996 a Julio de 1997.

2.2.- Esterilización de materiales y equipo.

En la limpieza de la cristalería se utilizó cloro comercial en concentraciones del 1 % durante 24 horas, posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada y se escurrió durante 2 horas para evitar que quedaran residuos de agua. La distribución del medio de cultivo se hizo en tubos de ensayo de dimensiones de 14.7 cm de longitud y 2.4 cm de diámetro, con cubierta de tapones de caucho número cuatro de un orificio.

Antes del establecimiento de los ápices caulinares, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos; las placas petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en el horno a temperatura de 170 °C durante 1 hora. También se esterilizó la cámara de flujo laminar inicialmente con alcohol al 90 % y después con irradiación de rayos ultravioletas durante 15 minutos para garantizar una mayor asepsia durante la manipulación de los tejidos. Al finalizar el proceso de corte, las pinzas y escalpelos se introdujeron en el tubo de ensayo que contenía alcohol al 90 %, posteriormente se realizó la inoculación de los tejidos, Una práctica para garantizar la asepsia durante el proceso de siembra fue la frotación en intervalos regulares de las manos de los operarios con alcohol.

2.3- Preparación de los medios de cultivo.

Como medio básico de cultivo en los diferentes experimentos de micropropagación se utilizaron las sales de Murashige & Skoog (1962), cuyos constituyentes se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Constituyentes del medio de cultivo básico propuesto por Murashige & Skoog (MS), (1962).

Solu- ción No.	Constituyentes	Cantidad de constituyente de solución Madre*	Concentración final, Masa **	Vol/solución Madre, /l medio basal
1	NH ₄ NO ₃ KNO ₃ MgSO ₄ 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	82 500 mg 95 000 mg 18 500 mg 8 500 mg	1650 mg 1900 mg 370 mg 170 mg	20 ml
2	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ 7H ₂ O ZnSO ₄ 7H ₂ O Na ₂ MnO ₄ 2H ₂ O CuSO ₄ 5H ₂ O CoCl ₂ 6H ₂ O	620 mg 2 176 mg 860 mg 25 mg 2.5 mg 2.5 mg	6.2 mg 22.3 mg 8.6 mg 0.25 mg 0.025 mg 0.025 mg	1.0 ml
3	KI	75.0 mg	0.83 mg	1.0 ml
4	CaCl 2H ₂ O	15 000 mg	440 mg	2.9 ml
5	Na ₂ EDTA FeSO ₄ 7H ₂ O	1 492 mg 1 114 mg	37.3 mg 27.8 mg	5.0 ml
6***	Tiamina.HCl	20.00 mg	0.4 mg	4-10 ml
7	m-Inositol	1 600 mg	100 mg	12.5 ml

* Disolver todos los constituyentes de la solución madre No. 1 en 1 000 ml de agua; todos los de la solución madre número 2 en 100 ml; el número 3 en 100 ml; el número 4 en 100 ml, los números 5, 6 y 7 en 200 ml cada uno.

** Concentración final de cada sustancia en un litro de medio basal.

*** Usar 4 ml ó 10 ml de la solución madre/litro de medio basal cuando se trata de cultivo de meristemas o ápices, respectivamente.

Los diferentes componentes de sales Murashige & Skoog (MS), se diluyeron en agua destilada y posteriormente desionizada y se agregaron en un orden definido. Una vez aforados los medios de cultivo, se les ajustó el pH a 6.1 mediante la adición de hidróxido de potasio (KOH) para incrementarlo o de ácido clorhídrico (HCl) para reducirlo. Como producto gelificante se utilizó el Agar-Bios-C, para facilitar la disolución se emplearon agitadores electromagnéticos hasta su ebullición, posteriormente se vertieron en tubos de ensayo.

2.4- Fase de establecimiento

2.4.1- Selección del material vegetativo

El material vegetativo utilizado se obtuvo en el Ingenio San Antonio (ISA) para el estudio se definieron los genotipos ISA 96-110 e ISA 96-111, la selección se realizó en plantaciones de 6 meses de establecidas en el campo de las que se tomaron plantas que se destacaban por su buen estado morfológico, fisiológico y fitosanitario.

2.4.2- Preparación del material vegetativo

Haciendo uso de machete se realizaron cortes a partir del primer entrenudo superior y otro para eliminar las hojas funcionales dejando únicamente las hojas envoltentes del tejido joven con una longitud de 10 cm aproximadamente, después se sumergieron en agua con detergente para desprender los residuos de polvo y otras impurezas, asimismo para reducir la fenolización y evitar la deshidratación de los explantes.

2.4.3- Desinfección del material vegetativo

a) Primera desinfección

Se practicó una reducción a los explantes hasta obtener un tamaño de aproximadamente 4 cm, luego se realizaron tres enjuagues con agua destilada para eliminar los residuos de detergente.

b) Segunda desinfección

Se realizó en la cámara de flujo laminar horizontal ubicada en el cuarto de siembra, los explantes se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3 % durante 10 minutos, posteriormente se efectuaron tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio, después se efectuó la reducción final de los explantes hasta un tamaño de aproximadamente 1.5 cm y los cortes se realizaron sobre platos petri previamente esterilizados.

2.4.4- Siembra del material vegetativo

Los explantes se sembraron individualmente en posición invertida en tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio de cultivo semi-sólido. Una vez concluida la inoculación de los ápices, fueron trasladados al cuarto de crecimiento donde permanecieron durante cuatro días en oscuridad absoluta, condición que se garantizó cubriendo cada gradilla con papel de aluminio, estas dos prácticas se realizaron para reducir la fenolización de los tejidos.

Una semana después se efectuó una limpieza para eliminar la acumulación de fenoles en la base de los explantes y se colocaron en posición normal en la superficie del medio de cultivo para facilitar la brotación de la yema apical.

2.4.5- Medios de cultivo en la fase de establecimiento

Diferentes autores reportan el medio de Murashige & Skoog (1962), como el más ampliamente utilizado para el cultivo de meristemas y ápices, reportándose su empleo en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*.

En la fase de establecimiento se experimentaron 4 variantes del medio de cultivo MS, cada una con 15 repeticiones, con alicuotas de 10 ml por tubo de ensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Variantes del medio básico Murashige & Skoog (1962), utilizada en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices caulinares de caña de azúcar (*Saccharum* sp), clones de ISA 96-110 e ISA 96-111.

Macrosales (%)	6-BAP* (mg/l)	Acido cítrico (mg/l)	Vitaminas (HM)** (mg/l)	Sacarosa (g/l)
100.0	0.00	50.0	100.0	30.0
100.0	0.20	50.0	100.0	30.0
100.0	0.40	50.0	100.0	30.0
100.0	0.60	50.0	100.0	30.0

* 6 BAP: 6 Bencil Amino Purina

** HM: Herz & Mec

2.4.6 Análisis de los datos

Para el análisis de los datos no paramétricos se realizó una tabla de porcentaje, para el estudio de establecimiento se utilizaron 60 ápices caulinares por clon. En esta fase se evaluaron cuatro variantes constituyendo cada una de ellas una réplica conformada por 15 explantes.

2.4.7- Variables evaluadas

Las evaluaciones se realizaron 25 días después que los explantes fueron colocados en posición normal en la superficie del medio. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- 1) Fenolización (tejido ennegrecido de la base)
- 2) Curvatura (dirección ortotrópica normal)
- 3) Contaminación de los explantes (bacterias y hongos)
- 4) Porcentaje de sobrevivencia de los tejidos
- 5). Coloración de los explantes

Se asignaron las siguientes categorías de color:

- A) Verde: explante con desarrollo activo.**
- B) Verde-amarillo: explante con desarrollo intermedio.**
- C) Amarillo: explante con lento proceso de adaptación.**
- D) Café-oscuro: explante sin desarrollo**

2.5- Fase de multiplicación

El principal objetivo de esta fase es producir el mayor número de propágulos útiles, con la finalidad de garantizar una rápida propagación sin afectar las características genéticas de los clones estudiados.

De las vitroplantas obtenidas en la fase de establecimiento se seleccionaron las más vigorosas con altura aproximada entre 1.5-2 cm y 2-3 hojas de los clones ISA 96-110 e ISA 96-111. La siembra se realizó en frascos magenta que contenían 30 ml de medio de cultivo con 5 explantes por frasco.

Se efectuaron tres subcultivos sucesivos para determinar la aptitud de los clones a la multiplicación en cuatro variantes de medio de cultivo MS (1962).

2.5.1- Medios de cultivo en la fase de multiplicación

Se estudió el efecto de tres concentraciones de 6-Bencil Amino Purina (6-BAP), de acuerdo a estudios previos efectuados por Jiménez (1995) las variantes utilizadas en la fase se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Variantes del medio MS (1962), utilizadas en la fase de multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum sp*), clones ISA 96-110 e ISA 96-111.

Sales MS (%)	6-BAP* (mg/l)	Acido cítrico (mg/l)	Vitaminas HM ** (mg/l)	Sacarosa (g/l)
100.0	0.00	50.0	100.0	30.0
100.0	0.10	50.0	100.0	30.0
100.0	0.30	50.0	100.0	30.0
100.0	0.50	50.0	100.0	30.0

* 6 BAP: 6 Bencil Amino Purina

** HM: Hcrnz & Mec

2.5.2- Diseño estadístico

Para este estudio se emplearon 5 frascos del tipo magenta por cada variante de medio de cultivo y se inocularon 5 plántulas por frasco para efectos del análisis estadístico, cada frasco se consideró una réplica.

El experimento se estableció en un diseño estadístico de bloque completamente al azar (B.C.A); en arreglo combinatorio (2 variedades y 4 concentraciones) dando lugar a ocho tratamientos. Para el procesamiento de los datos se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5 % de confianza.

2.5.3- Variables evaluadas

Las evaluaciones se realizaron cada tres semanas (21 días) periodo que correspondió a la finalización de cada subcultivo.

a.- Altura de planta

Se midió con una regla graduada en centímetros a partir de la base del tallo hasta el cuello de la planta.

b.- Número de hojas

Se contabilizó el número de hojas producidas por planta a las tres semanas de permanecer en el medio de cultivo.

c.- Número de brotes por planta

Se tomaron datos del número de nuevos brotes que surgen de la planta madre a las tres semanas de permanecer en el medio de cultivo.

2.6.- Fase de enraizamiento

La importancia de la fase de enraizamiento se fundamenta en que es necesario que las vitro-plantas próximas a ser adaptadas a condiciones ambientales tengan suficientes raíces que las preparen a las nuevas condiciones, donde a diferencia del medio de cultivo las plantas tienen que absorber el agua y los nutrientes del sustrato.

Este estudio se inició con la selección de plantas obtenidas en la fase de multiplicación, que presentasen una altura aproximada entre 2-3 cm, y un número de 2-3 hojas. Las plantas en este estado fueron posteriormente sembradas en frascos de tipo magenta conteniendo 15 ml de medio de cultivo líquido cada uno.

Se sembraron 5 plantas por frasco, para estudiar la respuesta al enraizamiento de cada uno de los clones, en las diferentes variantes del medio de cultivo.

2.6.1.- Medios de cultivo en la fase de enraizamiento

Se estudió el efecto de 3 concentraciones del ácido indolacético (AIA). Las variantes de medio de cultivo empleadas aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Variantes del medios MS (1962) utilizadas en la fase de enraizamiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum sp*), clones ISA 96-110 e ISA 96-111.

Macrosales (%)	AIA* (mg/l)	Vitaminas HM ** (mg/l)	Sacarosa (g/l)	pH
100.0	0.00	100.0	40.0	6.1
100.0	1.00	100.0	40.0	6.1
100.0	1.30	100.0	40.0	6.1
100.0	1.60	100.0	40.0	6.1

*AIA Acido 3-Indolacético

** HM: Hernz & Mee

2.6.2. Diseño estadístico

El número de réplicas utilizadas en cada tratamiento fue de diez frascos por variante de medio de cultivo, con un número de 5 plantas por frasco.

El experimento se estableció en un diseño de bloque completamente al azar (BCA), en arreglo bifactorial. Para el procesamiento de los datos se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan para las variables número de raíces por planta y longitud de raíces por planta; y en los datos no paramétricos sobrevivencia y número de plantas con raíces se realizó una tabla de porcentajes.

2.6.3.- Variables evaluadas

Las variables descritas en la fase de enraizamiento se definieron de acuerdo a la metodología propuesta por Jiménez (1995), ésta se realizó a las 4 semanas.

- 1.- *Sobrevivencia in vitro*
- 2.- Número de plantas con raíces
- 3.- Número de raíces por planta
- 4- Longitud de raíces (cm)

2.7.- Aclimatación de las vitroplantas

El objetivo principal de esta fase es lograr la adaptación de las vitroplantas al medio ambiente externo, con altas tasas de sobrevivencia en corto tiempo y con bajos costos. Esta fase es una de las más importantes para la micropropagación. Se emplearon vitroplantas provenientes de la fase de enraizamiento con abundante emisión de raíces y una altura aproximada de 3-4 cm y un número de 3-4 hojas. En el experimento se evaluaron 30 vitroplantas, las que fueron trasladadas a condiciones de sombreadero y sembradas en un sustrato de humus de lombriz.

Debido al éxito reportado por Orellana (1994) en estudios de aclimatación utilizando bandejas de poroplast), las vitroplantas se establecieron en bandejas de polieturano (poroplast). Cada bandeja con un número de 50 orificios cuyo diámetro y profundidad de 2 pulgadas. Se evaluaron 30 plantas ubicadas en los orificio céntricos de la bandeja, se descartaron las plantas sembradas en los bordes.

Posterior a la siembra, las bandejas se introdujeron en una cámara de propagación cubierta con plástico transparente para mantener una alta humedad relativa en su interior para evitar así la deshidratación de las vitroplantas, se descubrió a las 2 semanas y se implementó el riego por nebulización con una frecuencia de tres riegos por día, durante diez días, con una duración de 5 segundos por riego. En los siguientes 20 días se utilizó una frecuencia de 2 riegos por día, con una duración de un minuto por riego.

2.7.1.- Diseño experimental

El experimento se estableció en un BCA, en arreglo bifactorial. Para el procesamiento de los datos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para las variables número de hojas por planta, altura de planta (cm), longitud máxima de la última hoja; y en los datos no paramétricos porcentaje de sobrevivencia y número de brotes por plantas se elaboró una tabla de porcentajes, además se determinó el porcentaje de sobrevivencia y el desarrollo de las vitropantas durante 4 semanas en condiciones de aclimatación.

2.7.2.- Variables evaluadas

- 1.- Porcentaje de sobrevivencia
- 2.- Ahijamiento
- 3.- Número de hojas por planta
- 4.- Altura de planta (cm)
- 5.- Longitud máxima de la última hoja

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.- Fase de establecimiento

A continuación se presentan los datos de porcentaje de fenolización, curvatura, contaminación, sobrevivencia y coloración registrados en los explantes de caña de azúcar, clones ISA 96-110 e ISA 96-111, cultivados en 4 variantes del medio de cultivo MS (1962), a los 25 días de establecidos.

Los explantes del clon ISA 96-110 en el medio de cultivo conteniendo concentraciones de 0.6 mg/l de 6-BAP presentó el menor porcentaje de fenolización (33 %), mientras con 0.2 y 0.4 mg/l los porcentajes respectivos fueron de 86.66 y 73.33 %, en el clon ISA 96-111 en concentraciones de 0.2 mg/l de 6 BAP, el porcentaje de fenolización fue el más bajo con 26.66 % y, con 0.0, 0.4 y 0.6 mg/l los porcentajes respectivos fueron de 100, 40 y 40 %.

En el clon ISA 96-110 se observó el mayor porcentaje de plantas con curvatura (60 %) cuando se adicionó al medio de cultivo 0.6 mg/l de BAP. En concentraciones de 0.0 y 0.4 mg/l el número de plantas con curvaturas aproximadas con valores respectivos de 33 y 26.66 %, únicamente en el medio de cultivo con 0.2 mg/l de 6 BAP no presentaron plantas con curvatura. El clon ISA 96-111 en el medio de cultivo al que se le adicionó 0.2 mg/l de 6 BAP registró el mayor número de plantas con curvatura con el 73.33 %, con 0.4 y 0.6 mg/l presentaron valores iguales en un 46.66 %, en la variante testigo no se reportaron plantas con curvatura (Tabla 5).

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 5 la producción de fenoles y del número de ápices caulinares con curvatura, se evidenció que a mayor producción de fenoles se inhibió el desarrollo de las yemas apicales en el clon ISA 96-110 en concentraciones de 0.2 mg/l de 6-BAP y en el clon ISA 96-111 en la variante testigo.

Tabla 5. Porcentaje de fenolización en la base de ápices caulinares y número de plantas con curvatura en caña de azúcar (*Saccharum* sp), clones ISA 96- 110 e ISA 96-111 a los 25 días de establecidas

6-BAP (mg/l)	Fenolización (%)		Curvatura (%)	
	ISA 96- 110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA96-111
0.00	53.30	100.00	33.33	0.00
0.20	86.66	26.66	0.00	73.33
0.40	73.33	40.00	26.66	46.66
0.60	33.00	40.00	60.00	46.66
Total	61.58	51.66	29.99	41.66

Los resultados indican que la producción de fenoles está en dependencia del genotipo en sí, además pueden incrementarse por efecto de factores externos como es el tiempo de permanencia durante el proceso de siembra donde los explantes se van estableciendo de forma individual paulatinamente; de manera que el grado de fenolización es mayor en los explantes que permanecen más tiempo en agua destilada estéril, previo al establecimiento en el respectivo tubo de ensayo, también por factores químicos como es el tipo de oxidante y su baja concentración utilizada en el experimento. Se señala como otro posible factor que favorece la producción de oxidantes fenólicos, los tipos de corte del explante, en los que se diferencian en diámetro y altura de la base, en número y altura de las hojas meristemáticas del cilindro.

Jiménez (1995), reporta que las oxidaciones fenólicas constituyen un problema en el establecimiento de meristemas y ápices lo que se manifiestan como un ennegrecimiento en el medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una serie de afectaciones en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte.

En este estudio la respuesta de los tejidos está estrechamente relacionado con los factores químicos y fisiológicos señalados por Nitsch & Strain (1969), quienes observaron que en los clones de caña de azúcar sometidos a estudio, la producción de oxidantes fenólicos no refleja claramente el posible efecto que sobre su comportamiento ejercen incrementos en la concentración de la citocinina atribuyendo tal efecto al grado de inhibición que pudo ejercer (50 mg/l de ácido cítrico) adicionadas a todas las variantes.

Los contaminantes bacterianas y fungos no se presentan de forma generalizada en los tejidos implantados del clon ISA 96-110, únicamente se detectó el ataque de la bacteria *Erwinia* sp. en los ápices caulinares establecidos en los medios de cultivo suplidos con concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/l de 6 BAP, con porcentajes respectivos de 6.66 y 13.33 %. El ataque de hongos se presentó en la variante del medio de cultivo en concentraciones de 0.2 mg/l de 6 BAP con un porcentaje de 13.33. El clon ISA 96-111 no presentó contaminación bacteriana ni fungosa (Tabla 6).

Los resultados observados durante el establecimiento de los explantes, no indican necesariamente una relación directa entre los constituyentes de los medios de cultivo y los contaminantes, más bien la presencia de estos en los tejidos está en dependencia del grado de incidencia de los factores ambientales durante la exposición de los tejidos de las plantas donantes a tales condiciones y al proceso de desinfección y siembra de los explantes.

Villalobos & García (1982), reporta que el tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante hay más riesgo de contaminación aunque el crecimiento y la regeneración de las plantas es más rápida.

Casselles (1991), señala que la contaminación en la fase de establecimiento se origina desde el explante o por fallas en el proceso de desinfección e implantación. Otra causa es el no contacto del contaminante con el desinfectante debido a la morfología del explante y a la falta de asepsia durante

el corte de los tejidos. La presencia de bacterias en el explante se debe a que por su reducido tamaño, éstas pueden permanecer latentes en el interior de la célula, en los espacios intercelulares o en los haces conductores, por lo que quedan desprotegidos de los agentes desinfectantes.

El porcentaje de sobrevivencia de los explantes de los clones estudiados en las variantes del medio de cultivo se presenta en la Tabla 6.

El clon ISA 96-110 obtuvo 100 % de sobrevivencia en las variantes de medios de cultivo suplidas con 0.00 y 0.20 mg/l de 6-BAP, mientras que en las variantes de medio de cultivo con 0.40 y 0.60 fue de 93.33 %. El clon ISA 96-111 registró 100 % de sobrevivencia en todos los medios de cultivo estudiados.

Tabla 6. Porcentaje de contaminación con bacterias y hongos y sobrevivencia de los explantes de caña de azúcar (*Saccharum* sp), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, establecidos en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962) a los 25 días.

6-BAP (mg/l)	ISA 96-110		ISA 96-111		ISA 96-110		ISA 96-111	
	Bact.	Hon.	Bact.	Hon.	S	N	S	N
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
0.20	6.66	13.33	0.00	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
0.40	13.33	0.00	0.00	0.00	93.33	6.66	100.0	0.00
0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	93.33	6.66	100.0	0.00
Total	1.66	6.66	0.00	0.00	96.66	3.33	100.0	0.00

Bact.=Bacterias

Hon..=Hongo

S = Sobrevivencia

N=Necrótico

El análisis de la coloración de las hojas, en el clon ISA 96-110, las plantas que desarrollaron hojas con color verde se presentaron en porcentaje de 60 %, cuando las plantas fueron establecidas en un medio de cultivo con 0.6 mg/l de 6 BAP, superando al clon ISA 96-111, el cual no presentó plantas con hojas de esta coloración en ninguna de las concentraciones de 6 BAP (Tabla 7).

Las plantas que desarrollaron hojas con color verde-amarillo, en el clon ISA 96-110, alcanzaron porcentajes de 6.66, 13.0, 9.60 y 13.32 % en concentraciones respectivas de 0.0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/l de 6 BAP; en plantas del clon ISA 96-111 no se observó esta coloración en ninguna de las variantes de medio de cultivo estudiadas (Tabla 7).

El clon ISA 96-110 desarrolló plantas con hojas de color amarillo en porcentajes de 93.33, 60.0, 60.0 y 26.66 % en medios de cultivo a los que se les adicionó concentraciones de 0.0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/l respectivamente mientras que en el clon ISA 96-111 en las mismas concentraciones presentó porcentajes de 100, 100, 73.33 y 100 %.

La coloración café oscura de las hojas en el clon ISA 96-110 se observó únicamente en las plantas desarrolladas en los medios de cultivo con concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/l de 6 BAP con porcentajes de 29.99 y 30.33 %, respectivamente; mientras que en el clon ISA 96-111 se apreció únicamente cuando se adicionó 0.4 mg/l 6 BAP con 26.66 % (Tabla 7).

De acuerdo a la coloración verde y verde amarilla el clon ISA 96-110 obtuvo mejor respuesta de adaptación a los medios de cultivo en comparación al clon ISA 96-111, aunque este comportamiento no indica necesariamente que el clon ISA 96-110 presente mayor éxito en el establecimiento, considerándose que en este se observó el mayor porcentaje de color café oscuro, color al que se le atribuye menor grado de adaptación debido a que ésta coloración está estrechamente ligado a la producción de sustancias oxidantes de los explantes. De los resultados obtenidos se deduce que el predominio de la coloración amarilla de las hojas está relacionado a un lento proceso de adaptación al medio artificial, por la incidencia de factores externos e internos a los tejidos,

como son la producción de sustancias fenólicas, el tamaño del explante, condiciones ambientales y el genotipo del cultivo (Tabla 7).

Tabla 7. Color de las hojas (porcentaje) de ápices caulinares de caña de azúcar (*Saccharum* sp), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, establecidos en cuatro variantes de medio de cultivo MS (1962) a los 25 días.

6-BAP (mg/l)	ISA 96-110				ISA 96-111			
	(%)				(%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
0.0	0.0	6.7	93.3	0.0	0.0	0.0	100.0	0.00
0.2	0.0	13.0	60.0	30.0	0.0	0.0	100.0	0.00
0.4	0.0	9.6	60.0	30.3	0.0	0.0	73.3	26.0
0.6	60.0	13.3	26.7	0.0	0.0	0.0	100.0	0.00
Total	15.0	10.6	60.0	15.0	0.00	0.00	93.3	6.50

A = Verde

B = Verde-amarillo

C = Amarillo

D = Café oscuro

3.2 Fase de multiplicación

3.2.1. Altura de planta. Primero, segundo y tercer subcultivo

El análisis de varianza realizado a los datos de altura de planta nos muestran que existen diferencias estadísticas significativas en los factores estudiados (Tabla 14), también hubo significancia estadística en las interacciones

tratamientos. Las tablas se conformaron de esa forma para una mejor apreciación de los datos.

Las plantas del clon ISA 96-110 presentaron durante el primer subcultivo resultados estadísticamente superiores en las variantes de medio de cultivo con 0.1 y 0.5 mg/l de 6-BAP, en cambio las plantas del clon ISA 96-111, el medio de cultivo que indujeron los mejores resultados fueron con 0.0 y 0.1 mg/l. Los medios de cultivos con resultados estadísticamente inferiores en el clon ISA 96-110 fueron con 0.0 y 0.3 mg/l y en el clon ISA 96-111 con 0.3 y 0.5 mg/l (Tabla 8).

En el segundo subcultivo las plantas del clon ISA 96-110 obtuvieron la mayor altura en los medios de cultivo con 0.0, 0.1 y 0.5 mg/l de 6-BAP, en cambio las plantas del clon ISA 96-111 en el medio que no se aplicó 6-BAP indujo mayor altura. Los medios de cultivo con resultados estadísticamente inferiores en el clon ISA 96-110 fue con 0.3 mg/l y el clon ISA 96-111 con 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l (Tabla 8).

El tercer subcultivo en el clon ISA 96-111, las variantes de medio de cultivo que inducen mayor altura fue con 0.0 y 0.3 mg/l de 6-BAP, en cambio el clon ISA 96-110 produjo mayor altura sin la adición de 6-BAP. Los medios de cultivo con resultados estadísticamente inferiores en el clon ISA 96-111 fueron con 0.1 y 0.5 mg/l y en el clon ISA 96-110 los medios a los cuales se les agregó 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l. (Tabla 8).

Tabla 8. Promedio de altura (cm) en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-111 en cuatro variantes de medios de cultivo MS (1962), durante el primero, segundo y tercer subcultivo.

6 BAP (mg/l)	Primer Subcultivo		Segundo Subcultivo		Tercer Subcultivo	
	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111
0.00	1.69 c	2.00 a	2.35 a	1.94 bc	2.45 b	2.51 ab
0.10	1.99 a	1.86 ab	2.37 a	1.33 d	1.66 d	2.21 c
0.30	1.71 c	1.79 c	1.87 c	1.49 d	1.73 d	2.68 a
0.50	1.84 ab	1.78 c	2.16 a	1.54 d	1.33 e	2.08 c
Total	1.80	1.85	2.18	1.57	1.79	1.80

3.2.2. Promedio de brotes. Primer, segundo y tercer subcultivo.

Al analizar las variables número de brotes en el primer subcultivo el clon ISA 96-110, el medio de cultivo con 0.3 mg/l de 6-BAP indujo los mejores resultados, en cambio en el clon ISA 96-111 cuando no se adicionó citocinina. Resultados estadísticamente inferiores presentaron los medios de cultivo que contenían 0.0, 0.1 y 0.5 mg/l en el clon ISA 96-110 y en el clon ISA 96-111 con 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l (Tabla 9).

En el segundo subcultivo el clon ISA 96-111 presentó resultados estadísticamente superiores en los medios de cultivo a los que se les adicionaron 0.3 y 0.5 mg/l de 6 BAP, obteniéndose resultados estadísticamente inferiores en los medios de cultivo con 0.0 y 0.1 mg/l y el clon ISA 96-110 en todos sus medios de cultivo y en el clon ISA 96-110 aunque no se registraron diferencias estadísticas en los diferentes medios de cultivos, estos fueron

estadísticamente inferiores a los que se observaron en el clon ISA 96-111 (Tabla 9).

El clon ISA 96-110 en el tercer subcultivo obtuvo mayor número de brotes en los medios de cultivo con 0.3 y 0.5 mg/l de 6-BAP, en cambio en el clon ISA 96-111 con 0.1 mg/l. Los medios de cultivo que resultaron estadísticamente inferiores en el clon ISA 96-110 fue con 0.0 y 0.1 mg/l y en el clon ISA 96-111 con 0.0, 0.3 y 0.5 mg/l (Tabla 9).

De acuerdo a los resultados parece ser que para el clon ISA 96-110, la adición al medio de cultivo de 0.3 mg/l de 6-BAP resulta más adecuada, debido a que en los tres subcultivos se producen el mayor número de brotes. Esta respuesta fisiológica está en dependencia del comportamiento de la altura que alcance la planta, generalmente cuando se registran mayores alturas en éstas el número de brotes es menor como se observó en los dos clones estudiados.

Tabla 9.- Promedio de brotes en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-11 en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962), durante el Primero, Segundo y Tercer Subcultivo.

6- BAP (mg/l)	Primer Subcultivo		Segundo Subcultivo		Tercer Subcultivo	
	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111
0.00	1.40 cd	2.08 a	1.00 c	3.00 b	1.68 d	2.32 c
0.10	1.20 d	1.36 cd	0.96 c	3.32 b	1.20 e	3.32 b
0.30	2.02 a	1.36 cd	1.08 c	5.00 a	4.44 a	1.16 e
0.50	1.32 cd	1.64 bc	0.96 c	4.76 a	3.40 b	1.40 de
Total	1.43	1.61	1.00	4.02	2.68	2.05

En el clon ISA 96-111 los mejores resultados en altura de la planta, número promedio de hojas y número promedio de brotes durante los tres subcultivos se obtuvo en los medio de cultivo con adiciones de 0.0 y 0.3 mg/l de 6-BAP.

La mayor estabilidad de producción de brotes axilares se registró en las variantes de medio de cultivo sin adición de la citocinina y con 0.1 mg/l de 6-BAP, en los cuales las plantas a partir del primer subcultivo incrementaron moderadamente la producción de brotes hasta concluido el tercer subcultivo, este comportamiento favorece la implantación de una máxima producción de vitroplantas, puesto que se garantiza un número de plantas que reduce al mínimo el riesgo de la estabilidad genética del clon (Figura 1).

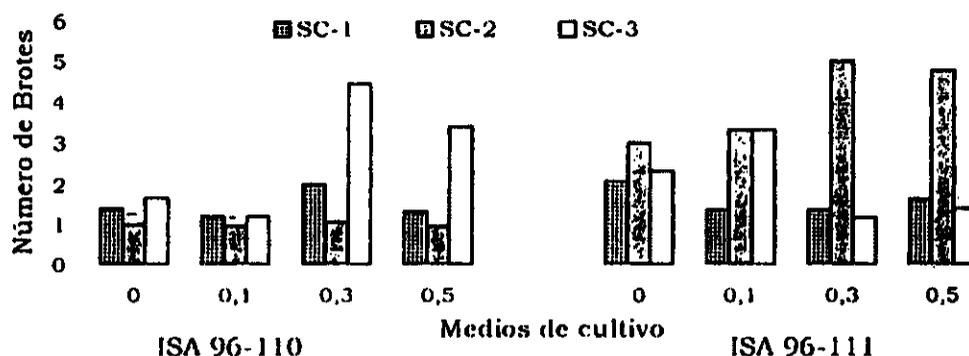


Figura 1.- Número de brotes por subcultivos obtenidos en la micro propagación de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA96-110 e ISA 96-111 en cuatro variantes de medios de cultivo MS (1962)

SC-1: Primer subcultivo

SC-2: Segundo subcultivo

SC-3: Tercer subcultivo

En el clon ISA 96-111 la producción de brotes se incrementó significativamente en los medios de cultivo suplidos con 0.3 y 0.5 mg/l de 6 BAP durante el segundo subcultivo, todo lo contrario ocurre en el clon ISA 96-110 en el segundo subcultivo.

De acuerdo con Rodríguez *et al* (1897), diferentes generaciones pueden existir en el mismo subcultivo, es posible distinguir fácilmente entre el brote inicial madre y las progenies "hijos y nietos"; plantas que han tenido una planta madre en el procedimiento de los subcultivos demuestran un gran número y desarrollo de las hojas o bien un gran número de raíces y además son altas, sin embargo cuando los brotes son de los considerados hijos, producen más brotes, pero son más cortos y con menor número de hojas y raíces.

Reyes (1995), en los clones de Plátano Cuerno (AAB) y Banano Enano Ecuatoriano (AAA), observó variaciones en el número de brotes dentro de los subcultivos aduciendo dicho comportamiento a la procedencia del brote utilizado (madres-hijos-nietos), debido a que en los subcultivos sucesivos la producción de brotes fue irregular, por lo que recomienda que en la rutina de propagación de los laboratorios comerciales los brotes madres deben ser utilizados en un máximo de 5 generaciones (subcultivos) y después seleccionarlos para pasarlos a la fase de enraizamiento.

3.2.3 Número de hojas. primer, segundo y tercer subcultivo

En el primer subcultivo en el clon ISA 96-110 la emisión del número de hojas se favoreció con adiciones al medio de cultivo de 0.1 mg/l de 6-BAP, mientras que en el clon ISA 96-111 fue con 0.5 mg/l. Resultados estadísticamente inferiores obtuvo el clon ISA 96-110 en los medios suplidos con 0.0, 0.3 y 0.5 mg/l y el clon ISA 96-111 con 0.0, 0.1 y 0.3 mg/l (Tabla 10).

Tabla 10.- Promedio de hojas en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA 96-110 e ISA 96-11 en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962), durante el Primero, Segundo y Tercer Subcultivo.

6- BAP (mg/l)	Primer Subcultivo		Segundo Subcultivo		Tercer Subcultivo	
	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111
0.00	2.38 ef	2.61 bc	3.2 ab	4.01 a	2.56 d	3.20 b
0.10	2.75 a	2.54 cd	2.78 cd	4.10 a	2.50 d	3.03 c
0.30	2.22 f	2.43 de	2.95 c	4.11 a	2.95 c	2.90 c
0.50	2.56 c	2.71 a	2.92 cd	2.71 d	2.91 c	3.46 a
Total	2.48	2.57	2.96	3.73	2.73	3.14

El clon ISA 96-111 registró en el segundo subcultivo plantas con mayor emisión del número de hojas en los medios suplidos con 0.0, 0.1 y 0.3 mg/l de 6-BAP, en cambio en el clon ISA 96-110 cuando no se adicionó 6-BAP. En el clon ISA 96-111 el medio de cultivo que indujo resultados estadísticamente inferiores fue con 0.5 mg/l y en el clon ISA 96-110 con 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l (Tabla 10).

La emisión del mayor número de hojas en el tercer subcultivo en el clon ISA 96-111 se produjo en los medios de cultivo con 0.5 y 0.0 mg/l de 6-BAP, superando estadísticamente a las desarrolladas en los medios de cultivo con 0.1 y 0.3 mg/l y al clon ISA 96-110 en todos los medios de cultivo (Tabla 10).

De acuerdo a los resultados anteriormente detallados en ambos clones prevaleció la tendencia de mayor incremento de la emisión del número de hojas en el Segundo Subcultivo, y una disminución en el tercer subcultivo.

3.3 Fase de enraizamiento

El porcentaje de sobrevivencia en los clones ISA 96-110 e ISA 96-111 fue mayor cuando se adicionó 1.3 mg/l de AIA con porcentajes respectivos de 87.25 y 83.33 %, mientras que con adiciones de 1.0 mg/l el porcentaje de sobrevivencia fue de 82.20 % en el clon ISA 96-111 y de 80.46 % en el clon ISA 96-110; con 1.6 mg/l, la sobrevivencia fue de 81.30 % en el clon ISA 96-111 y de 78.04 % en el clon ISA 96-110; en el tratamiento testigo ambos clones presentaron 77.77 %.

En cuanto al porcentaje de plantas enraizadas en el clon ISA 96-111 obtuvo un mayor porcentaje cuando se les agregó 1.0, 1.3 y 1.6 mg/l de AIA con valores respectivos de 100, 100 y 90 %, mientras que en el tratamiento testigo reportó un 77.32 %. En el clon ISA 96-110 en el tratamiento testigo la emisión de raíces fue de 89.79 % superando la emisión producida en los tratamientos a los que se les adicionó AIA; se observó que a medida que aumenta la concentración de AIA en el medio de cultivo, fue mayor el porcentaje de plantas enraizadas, registrándose porcentajes de 57.14, 64.0 y 75 % para las variantes de medios de cultivo a los cuales se les adicionó 1.0, 1.3 y 1.6 mg/l de AIA (Tabla 11).

En el clon ISA 96-111 la adición de AIA en concentraciones entre 1.0 y 1.6 mg/l inducen a la producción de raíces en casi todas las plantas establecidas, existiendo una fuerte relación entre el genotipo y la concentración de auxinas. En el clon ISA 96-110 no se observó esta tendencia debido a que se obtuvo un mayor porcentaje de plántulas enraizadas en el tratamiento testigo.

Estos resultados reflejan que la producción de raíces está en dependencia del genotipo y de la interacción que puede producirse entre el AIA y la sacarosa indicando que en el cultivar ISA 96-110 es innecesaria la adición de esta auxina (Tabla 11).

Tabla 11.- Porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento de caña de azúcar (*Saccharum* sp), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, desarrolladas en 4 variantes del medio de cultivo MS (1962), a los 30 días.

AIA (mg/l)	Sobrevivencia (%)		Plantas enraizadas (%)	
	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111
0.00	77.77	77.00	89.79	77.32
1.00	80.46	82.20	57.14	100.00
1.30	87.25	83.33	69.00	100.00
1.60	78.04	81.30	75.00	90.00
Total	80.88	80.95	72.73	91.83

El análisis de la fase de enraizamiento, nos muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El clon ISA 96-111 obtuvo el mayor número de raíces por planta en la variante de medio de cultivo que se adicionó 1.3 mg/l de AIA, resultando superior a las variantes de medio de cultivo que se les agregó 0.0, 1.0 y 1.6 mg/l, y al clon ISA 96-110 en todas las variantes de medio de cultivos (Tabla 12).

El clon ISA 96-111 reportó la mayor longitud de raíces por planta en la variante de medio de cultivo que se aplicó 1.3 mg/l de AIA, resultados similares presentaron las variantes de medio de cultivo con 1.0 y 1.6 mg/l. Resultados estadísticamente inferiores registró el clon ISA 96-110 en todas las variantes de medio de cultivo.

En ésta fase el clon ISA 96-111 reportó los mejores resultados en número y longitud de raíces por planta en la variante de medio de cultivo que se le agregó 1.3 mg/l de AIA (Tabla 12).

Tabla 12. Número y longitud promedio de raíces por planta en caña de azúcar (*Saccharum sp*), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, desarrollados en 4 medios de cultivo MS (1962) a los 30 días.

AIA (mg/l)	Promedio de raíces		Longitud promedio de raíces	
	ISA 96-110	ISA 96-111	ISA 96-110	ISA 96-111
0.00	2.55 d	5.00 b	2.80 d	2.85 d
1.00	3.80 c	5.40 b	2.55 d	4.80 b
1.30	4.80 b	7.40 a	4.10 c	5.75 a
1.60	3.80 c	5.40 b	1.75 e	5.00 b

En ambos clones las adiciones de 1.3 mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa favorecieron al incremento del porcentaje de sobrevivencia, longitud de raíces y número de raíces, demostrándose que a esta concentración es favorable en la fase de enraizamiento en comparación con adiciones de 1.0 mg/l, debido a que la sobrevivencia de la planta es ligeramente inferior a la obtenida con 1.3 mg/l. Con la adición de 1.6 mg/l de AIA se produjo una ligera reducción en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas, aun cuando se obtuvo un número aceptable de raíces, esta respuesta se debe al efecto osmótico a que se somete cuando al medio de cultivo se le adicionó concentraciones altas de AIA (1.6 mg/l) y sacarosa al 40 g/l (Tabla 11 y Tabla 12)

Los resultados de esta fase coinciden con los obtenidos por Jiménez (1995) que reportó abundante enraizamiento y un crecimiento vigoroso de las plantas y recomienda un medio compuesto por las sales MS suplidos con 1.3 mg/l de AIA y 40 g de sacarosa en medio líquido.

Mareztkie e Hiraki (1980), Ballester & González (1983) reportaron que al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se incrementa el enraizamiento *in vitro* de caña de azúcar, para algunos autores aún no ha sido

esclarecido si el efecto de la sacarosa es solamente osmótico o si intervienen otros factores.

El enraizamiento de plantas de caña de azúcar propagadas *in vitro* fue considerado un serio problema debido al efecto inhibitorio de cultivos continuos en medios con citocininas durante la fase de multiplicación (Sauvaire & Galzy, 1981; Ballester & González, 1983), sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que con el empleo de AIA a una concentración de 1.1 mg/l se puede contrarrestar este efecto e inducir la formación del sistema radicular y el crecimiento de las plantas.

El papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocido, recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de enraizamiento, y es precisamente el AIA una de las auxinas más empleadas en esta fase (Vázquez & Tórrez, 1981; Hu & Wang, 1983).

3.4-Fase de aclimatación

Una de las etapas que reviste gran importancia dentro de la técnica de propagación *in vitro* es la aclimatación (endurecimiento) de las vitroplantas a condiciones ambientales y su posterior establecimiento a condiciones de campo. La eficiencia en la aclimatación es trascendental par la propagación comercial debido a que esto influye en todo el proceso y en la calidad final de la planta.

Las vitroplantas en un inicio deben cultivarse en condiciones que se acerquen al ambiente *in vitro*, alta humedad relativa y baja intensidad lumínica. Posteriormente debe reducirse de manera gradual la humedad relativa y aumentar la intensidad luminosa para que las plantas se desarrollen en un ambiente parecido a las condiciones de campo.

El análisis de los datos no paramétricos reflejan que el mayor porcentaje de sobrevivencia y ahijamiento lo obtuvo el clon ISA 96-111 con porcentajes respectivos de 83.33 y 56.66 %, mientras que en el clon ISA 96-110 se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia y ahijamiento de 66.66 y 40 % respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de sobrevivencia y ahijamiento de las plantas de caña de azúcar (*Saccharum sp*), clones ISA 96-110 e ISA 96-111 en la fase de aclimatación a los 30 días.

Cultivar	Sobrevivencia (%)	Ahijamiento (%)
ISA 96-110	66.66	40.00
ISA 96-111	83.33	56.66
Total	74.99	48.33

En el análisis de varianza de las variables número de brotes, altura de planta y longitud de la última hoja el clon ISA 96-111 resultó estadísticamente superior al clon ISA 96-110 con valores respectivos de 3.400, 5.183 y 21.367 cm. Los valores del clon ISA 96-110 fueron los siguientes 2.633, 3.897 y 13.733 cm (Tabla 14).

Tabla 14 Promedio de brotes, altura de planta y longitud de la última hoja de plantas de caña de azúcar (*Saccharum sp*), clones ISA 96-110 e ISA 96-111 en la fase de aclimatación a los 30 días.

Cultivar	Número de brotes	Altura de planta	Longitud de la última hoja
ISA 96-110	2.63 b	3.89 b	13.73 b
ISA 96-111	3.40 a	5.18 a	21.37 a

Se encontró una respuesta genotípica a la adaptación de las vitroplantas a condiciones de sombreadero. El clon ISA 96-111 demostró los mejores resultados en las fases del proceso de micropropagación, presentando plantas

con mayores alturas y emisión de raíces, las cuales fueron separadas y sembradas de forma individual. El comportamiento de éstas en condiciones ambientales obtuvo resultados superiores en comparación con los del clon ISA 96-110, en cuanto a las variables porcentaje de sobrevivencia y ahijamiento.

Orellana (1994), evaluó siete variantes diferentes de sustratos utilizando bolsas de polietileno en la adaptación de vitroplantas del clon de banano Gran Enano (AAA), obtuvo los mejores resultados en sustratos constituidos en proporciones de entre 50-70 % suelo y 50-30 % de humus de lombriz, reportando sobrevivencias mayores del 80 %, a los 60 días de trasplantadas.

IV. CONCLUSIONES

- 1** En la fase de establecimiento el medio de cultivo constituido por las sales completas MS (1962), las vitaminas HM (1969), 50 mg/l de ácido cítrico, 0.6 mg/l de 6 BAP, 30 g/l de sacarosa y el estado sólido del medio de cultivo indujeron a un mayor crecimiento de los ápices caulinares en ambos clones.
- 2** - En la fase de multiplicación el clon ISA 96-110 presentó los mejores resultados en cuanto al número de brotes por planta, en el medio de cultivo constituido por las sales completas MS (1962), las vitaminas HM (1969), 50 g/l de ácido cítrico, 0.3 mg/l de 6-BAP, 30 g/l de sacarosa y el estado sólido del medio de cultivo, durante los tres subcultivos evaluados. Por otro lado, el clon ISA 96-111 reportó los mejores promedios en altura de planta, número de hojas y número de brotes en los medios de cultivo sin adición de 6-BAP o suplidos con 0.3 mg/l de este regulador de crecimiento.
- 3** - En la fase de enraizamiento el medio de cultivo constituido por las sales completas MS (1962), las vitaminas HM (1969), 1.3 mg/l de AIA, 40 g/l de sacarosa y el estado líquido del medio de cultivo promovieron los mejores resultados en las variables estudiadas para ambos clones.
- 4** - En la fase de aclimatación el clon ISA 96 111 registró resultados superiores a las reportadas en el clon ISA 96-110 en todas las variables estudiadas.

V. RECOMENDACIONES

- 1 - Establecer un estudio comparativo entre los tejidos provenientes de ápices caulinares, meristemas y yemas, con el objetivo de definir un mejor manejo en las diferentes fases del proceso de micropropagación, en cuanto a, porcentaje de contaminación fenolización, establecimiento y desarrollo de los tejidos.**
- 2 - Realizar estudios de micropropagación en caña de azúcar que incorporen los siguientes aspectos:**
 - **Concentración de las sales MS (1962)**
 - **Consistencia de los medios de cultivo (sólido y líquido)**
 - **Productos gelificantes (agargel, phytigel, gelrite, bacto-agar, etc.)**
 - **Número de plantas por frasco.**
 - **Determinación del número de subcultivos necesarios por genotipo.**
- 3 - Adicionar al medio de cultivo en estado líquido AIA en concentraciones de 1.3 mg/l cuando se pretenda inducir el enraizamiento de las plantas de ambos clones.**
- 4 - En la fase de aclimatación realizar estudios donde se empleen diferentes tipos de sustratos, métodos de desinfección, regulación de la luz, dosis y tipos de fertilización, frecuencia y tiempo de riego.**

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arias, O. & M. Valverde,** 1988. Producción y variación somaclonal de plantas de banano variedad Grande Naine producidas por cultivo de tejidos. En: Revista de la Asociación Bananera Nacional. 11(28): 6-11.
- Ballester, R. & A. González.** 1983. Comprobación de la eficiencia de nuevos medios de cultivo en el enraizamiento de plantines de caña de azúcar (*Saccharum* sp híbrido) obtenido por cultivo de tejido. Trabajo de diploma Universidad Central de las Villas. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Blanco, M.** 1986. Cultivos industriales. Ed. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias, Managua. Nicaragua. 60-65 Pp.
- Cassells A.** 1991. Culture contamination. En: Problem in tissue culture Micropropagation. Debergh P, Limmermon RH (eds). Klawer Academic Publishers. Dordrecht 31-45.
- Fauconier, K & D. Basse Reau.,** 1975. La caña de azúcar. Ed. Blume. Barcelona, España.
- González, C.** 1995. Evaluación, detección y métodos del control de variación somaclonal en el clon Gran Enano (*Musa* sp) (AAA). Tesis MSc. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central de las Villas, Cuba. 50 p.
- Hu, C. V. & J. P. Wang.** 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. In: Handbook of plant cell. Ed by Evans, D. A.; Ammirato, P. V.; Yameda, K. 256-290 Pp.
- Jiménez, E.** 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* sp híbrido) Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas. p 93.

- Maretzki, A.; P. Hiraki, 1980** Sucrose promotion of roots formation in plantlets regeneration from callus of *saccharum* spp. *Oyton* 38 (1): 85-86.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 1998.** Agricultura y Desarrollo. Publicación No. 41. 20 pp.
- Murashige & T.; F. S. Skoog, 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. In: *Plant physiol* (5): 173-197 Pp.
- Nitsch, J. P.; G. C. Strain (1969).** Effect de diverses cytokinines sur le brunissement de explants canne a sucre, *CR Acad SC*: Pp 268. 806-809.
- Orellana, P. P. 1994.** Tecnología para la micropropagación in vitro de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Pérez, J. 1988.** Producción de semillas y propágulos. Apuntes para un libro de texto. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central de las Villas, Villa Clara, Cuba.
- Pérez Ponce, J. N. (1987).** Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Leipzig, RFA.
- Pérez Ponce, J. N. (1991).** Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. En cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Ed. Roca, W. M.; Mroginsky, L. A.. Cali, colombia. 544-556 Pp.
- Reyes, G. 1995.** Micropropagation and *in vitro* conservation of two *musa* genotypes: Banana (AAA) and Plantaian (AAB). Tesis de Maestría. Genetik Centrum, Agricultural Sciences University, Uppsala, Suecia.

- Rodríguez, M. J.; J. R. Lorenzo, & A. García, 1987.** Significance of physiological history in the vegetative propagation of banana shoot tips. *Acta Horticulturae* 212: 61-68 Pp.
- Sandoval, J.A.** 1985. Micropropagación de musáceas. *Revista de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA), Costa Rica.* 9(24):21-23.
- Sauvaire, D. & R. Galzy, 1981.** Micropropagation de la canne a sucre par bouturage *in vitro*. Action d' une auxine et d' une cytokinine. *L' Agonomie Tropicale* (1).
- Sauvaire, D. & R. Galzy, 1983.** Une method de planification experimentale appliquee aux cultures de tissus végétaux. Exemple de la canne a sucre (*Saccharum* sp) *Can. J . Bot.* 58: 264-269.
- Vásquez, B. E.; Tórrrez, G. S.** 1981. Fisiología vegetal. Crecimiento y desarrollo. Ed. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana, Cuba Pp. 362-371.
- Villalobos, A. & V. A. García, 1982.** Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) Libre de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos, *Agrociencia.* 48: 107- 118.

ANEXOS

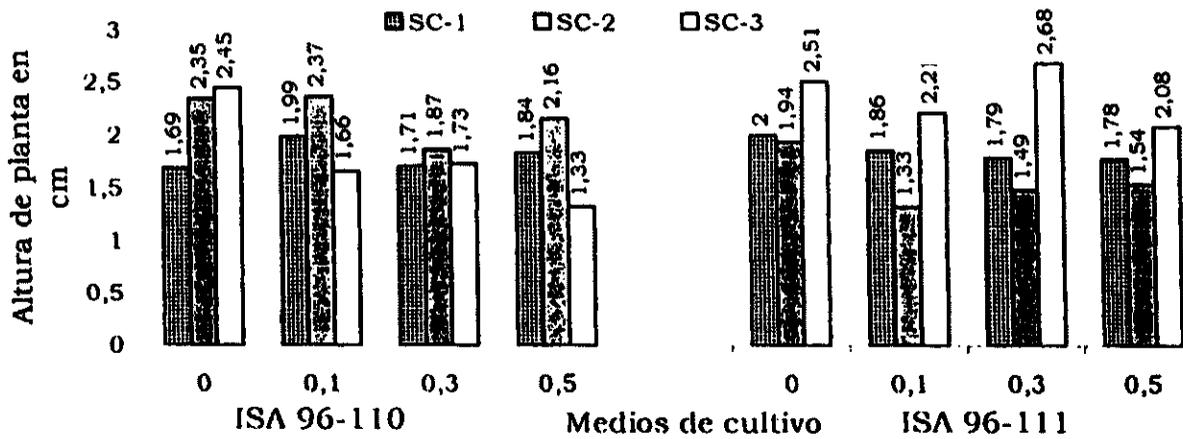


Figura 2.- Altura de planta (cm) por subcultivos obtenidos en la micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* sp., clones ISA96-110 e ISA 96-111 en cuatro variantes de medios de cultivo MS (1962).

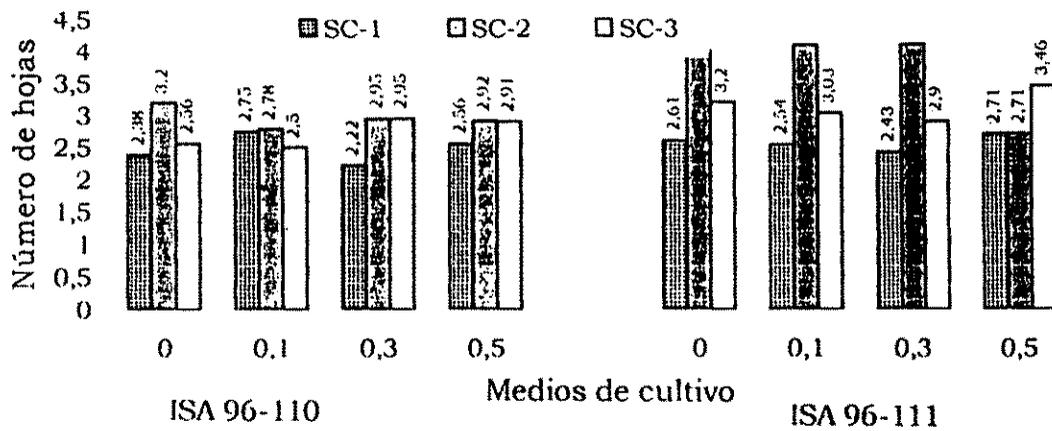


Figura 3.- Número de hojas por subcultivos obtenidos en la micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* sp.), clones ISA96-110 e ISA 96-111 en cuatro variantes de medios de cultivo MS (1962).

Tabla 15. Promedio de altura (cm), número de brotes y número de hojas en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp), clones ISA 96-110 e ISA 96-111, desarrolladas en 4 variantes de medio de cultivo durante 3 subcultivos.

6-BAP (mg/l)	Clon ISA 96-110					Clon ISA 96-111				
	Subcultivos					Subcultivos				
	1	2	3	X	Total	1	2	3	X	Total
Altura promedio de plantas										
0.00	1.69 c	2.35 a	2.45 b	2.16	6.49	2.00 a	1.94 bc	2.51 ab	2.15	6.45
0.10	1.99 a	2.37 a	1.66 d	2.00	6.02	1.86 ab	1.33 d	2.21 c	1.80	5.40
0.30	1.71 c	1.87 c	1.73 d	1.77	5.31	1.79 c	1.49 d	2.68 a	1.98	5.96
0.50	1.84 ab	2.16 a	1.33 e	1.77	5.33	1.78 c	1.54 d	2.08 c	1.80	5.40
Total	1.80	2.18	1.79			1.85	1.57	1.80		
Número promedio de brotes										
0.00	1.40 cd	1.00 c	1.68 d	1.36	4.08	2.08 a	3.00 b	2.32 c	2.46	7.40
0.10	1.20 d	0.96 c	1.20 e	1.12	3.36	1.36 cd	3.32 b	3.32 b	2.66	8.00
0.30	2.02 a	1.08 c	4.44 a	2.44	7.32	1.36 cd	5.00 a	1.16 e	2.50	7.52
0.50	1.32 cd	0.96 c	3.40 b	1.89	5.68	1.64 bc	4.76 a	1.40 de	2.60	7.80
Total	1.43	1.00	2.68			1.61	4.02	2.05		
Número promedio de hojas										
0.00	2.38 ef	3.20 ab	2.56 d	2.71	8.14	2.61 bc	4.01 a	3.20 b	3.27	9.82
0.10	2.75 a	2.78 cd	2.50 d	2.67	8.03	2.54 cd	4.10 a	3.03 c	3.22	9.67
0.30	2.22 f	2.95 c	2.95 c	2.72	8.16	2.43 de	4.11 a	2.90 c	3.14	9.44
0.50	2.56 c	2.92 cd	2.91 c	2.79	8.39	2.71 a	2.71 d	3.46 a	2.96	8.88
Total	2.48	2.96	2.73			2.57	3.73	3.14		