

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**



**SEMINARIO**

**MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR (Saccharum sp.).**

**QUE PRESENTA:**

**ERNESTO ORTEGA RIDAURA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA**

**MARÍN, N. L.**

**NOVIEMBRE 1995**

T  
SB229  
.M6  
07  
C.1



1080062219

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

FACULTAD DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



SECRETARÍA GENERAL DE ASESORIA

**SEMINARIO**

RECONOCIDO POR

**MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR (Saccharum sp.)**

Requisito y aprobado como requisito para

**QUE PRESENTA:**

INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

**ERNESTO ORTEGA RIDAURA**

COMISION REVISORA:

**COMO REQUISITO PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA**

Autor principal



MARÍN, N. L.

NOVIEMBRE 1995

12341 E

T  
SB 229  
MG  
07

040-634  
FA1  
1995  
C.5



Biblioteca Central  
Magna Solidaridad

*F. Ferris*



BURAU Rendón Ferris  
UANL  
FONDO  
TESIS LICENCIATURA

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

**SEMINARIO**

**MICROPROPAGACIÓN EN CAÑA DE AZÚCAR (Saccharum sp.)**

**ELABORADO POR:**

**ERNESTO ORTEGA RIDAURA**

**Aceptado y aprobado como requisito para**

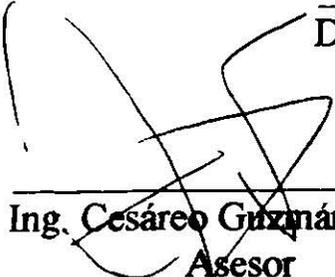
**optar por el título de**

**INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA**

**COMISIÓN REVISORA:**



**D. C. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda**  
**Asesor principal**



**Ing. Cesáreo Guzmán Flores**  
**Asesor**



**M. Sc. Fermín Montes Cavazos**  
**Asesor**

## AGRADECIMIENTOS

A tí Madre, has sido mi mejor ejemplo. Con el cariño, confianza y apoyo que siempre me has dado puedo lograr todos mis propósitos.

A tí Yaya, tu fuerza y espíritu por la vida, me han demostrado que todo tiene un lado positivo y que no hay nada que nos detenga.

A tí Isabel, además de hermana has sabido ser mi mejor amiga. Te agradezco todos los empujones que me ayudaron a superar esas indecisiones.

A la familia Rodríguez, me han abierto sus puertas y apoyado desde el principio de mi carrera. Les agradezco su amistad y confianza.

A mis compañeros y amigos, simplemente por ser lo que són. Gracias por haberme hecho todo tan fácil.

A mis asesores, además de brindarme todo su apoyo, me han tenido la más grande de las paciencias (en especial el Ing. Guzmán).

A mis buenos y malos maestros, su ejemplo me ha enseñado qué hacer y qué no hacer.

## INDICE

	Página
1.- Introducción.....	1
2.- La caña de azúcar.....	1
2.1.- Descripción botánica.....	3
2.2.- Técnicas de siembra.....	4
3.- Cultivo de tejidos vegetales (CTV).....	6
3.1.- Historia.....	6
3.2.- Medios de cultivo.....	8
3.2.1.- Componentes de un medio de cultivo.....	8
3.3.- Usos y aplicaciones.....	11
3.3.1.- Micropropagación.....	12
3.3.1.1.- Cultivo de ápices.....	13
4.- CTV en caña.....	15
4.1.- Antecedentes.....	15
4.2.- Técnicas comunes de CTV aplicables a la caña de azúcar.....	16
4.2.1.- Micropropagación en caña a través de cultivo de ápices.....	17
4.2.1.1.- Medios de cultivo utilizados en caña.....	19
4.2.1.2.- Fases de la micropropagación.....	21
4.2.1.2.1.- Establecimiento.....	21
4.2.1.2.2.- Ahijamiento.....	24
4.2.1.2.3.- Enraizamiento.....	26
4.2.1.2.4.- Aclimatación.....	27
4.2.2.- Micropropagación de caña a través de cultivo de callos.....	27
5.- Trabajo práctico de la fase de establecimiento <u>in vitro</u> en caña de azúcar.....	29
5.1.- Descripción de la metodología utilizada.....	29
5.1.1.- Preparación de medios de cultivo.....	29
5.1.2.- Desinfestación.....	32
5.1.3.- Establecimiento <u>in vitro</u> .....	32
5.2.- Resultados.....	35
5.2.1.- Longitud del brote apical.....	35
5.2.2.- Grado de oxidación.....	35
5.3.- Conclusiones y discusiones.....	36
5.3.1.- Longitud del brote apical.....	36
5.3.2.- Grado de oxidación.....	37
6.- Bibliografía.....	38

## Introducción

La caña de azúcar (Saccharum sp.) es un cultivo de regiones tropicales y subtropicales de gran importancia en algunos países en vías de desarrollo, por ser la materia prima esencial para una industria generadora de numerosos empleos, así como por el consumo interno de su producto final (el azúcar), y la fuente de divisas que representa su exportación.

Durante 1980 se produjeron 100 millones de toneladas de azúcar en el mundo, de los cuales el 61.2 % provenían de caña (Lichts, 1981); para 1988 se produjo la misma cantidad (Arrollo, 1988) a pesar del aumento poblacional; esto puede explicarse debido al ingreso de otros edulcorantes al mercado internacional, principalmente el jarabe de maíz y algunos artificiales como la sacarina y el aspartame.

El azúcar de caña ha entrado a una competencia muy dura en la cual, su composición granulada representa su única ventaja; característica que no se encuentra en el jarabe de maíz. La composición líquida del jarabe de maíz ha limitado su invasión a solo el 40% del mercado de consumo de edulcorantes (Arrollo, 1988).

La quiebra del agrosistema cañero representaría una gran desgracia; ya que en México durante 1994 se sembraron 611,681 Has y se produjeron 3.54 millones de toneladas de azúcar (INEGI, 1995); ello muestra su importancia, así como los graves problemas sociales que su caída originaría.

Para que lo anterior no suceda, dentro del campo de la biotecnología se están utilizando las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) in vitro como herramienta dentro de programas de mejoramiento genético. Dichos programas

tienen por objetivo obtener variedades de alto rendimiento (200 tons/Ha), alto contenido de sacarosa y otras cualidades que hagan más competente al cultivo de la caña de azúcar dentro de la carrera de producción de edulcorantes. Por medio de la micropropagación (una de las técnicas de CTV) se acorta el período de liberación de estas nuevas variedades, de entre 3 y 5 años a solo de 16 a 24 meses (Vasil, 1988).

Debido a la importancia de la técnica de micropropagación en el cultivo de la caña, el presente seminario tiene por objeto presentar una revisión general acerca de los antecedentes, aplicaciones, medios de cultivo más usados y los factores que deben considerarse en la metodología de dicha técnica. Además, se expone la experiencia obtenida en un trabajo consistente en realizar la primer fase de la micropropagación de caña de azúcar, a través de ápices caulinares.

## 2.- La caña de azúcar.

El cultivo de la caña de azúcar estaba incluido en la agricultura del hombre primitivo hace 20-30,000 años (Brandes, 1929), también se tienen conocimientos del aprovechamiento de este noble cultivo por civilizaciones de la India y China. Su origen botánico está en Nueva Guinea y se le considera una planta perenne de la familia de las gramíneas. Pertenece al género Saccharum de la tribu Andropogoneae, el cual tiene solo 5 especies: *officinarum* (caña noble), *sinense*, *barberi*, *spontaneum* y *robustum* (especie botánica de arranque). De ahí que su base genética para la producción de cañas comerciales es estrecha y a través de 60 años de hibridaciones entre ellas, se ha agotado la variabilidad creada por cruza simples, multilaterales, consanguíneas, retrocruzas, policruzas e inclusive cruza intergenéricas (Krikorian, 1983). Por lo que es necesario ampliar la variabilidad y esto se puede lograr con técnicas de CTV.

### 2.1.- Descripción botánica.

La planta de caña posee un amplio sistema radical, del cual emergen tallos subterráneos delgados en la base y que se van ensanchando para salir a la superficie erectos y con una forma cilíndrica. El tallo es de longitud, color y forma variable según la especie, se divide en cañutos por los nudos y cada uno posee una yema axilar y una hoja envolvente. Las hojas son laminares de 1 a 1.5 m de largo y de 2 a 14 cm de ancho y están sujetas al nudo por una gran vaina. El cogollo o punta de tallo contiene la yema apical y un conjunto de hojas y entrenudos en desarrollo, que por ser pobres en sacarosa son desechados previamente al proceso de industrialización (Humbert, 1974).

## 2.2.- Técnicas de siembra.

En forma comercial se siembran 12 ton/Ha de trozos de tallo (30 cm de longitud) que contengan 3 yemas como mínimo. Se les coloca al fondo del surco y se les cubre con tierra, esto se realiza en otoño o primavera para darles el primer corte a los 15 o 18 meses de sembrada. Después del corte, brotan nuevos tallos (primarios, secundarios y terciarios) provenientes de yemas de los tallos del macollo aún enterrado. Los cortes subsiguientes se realizarán cada 12 meses, recomendándose dar solo 6 cortes durante el ciclo de vida de la planta. El rendimiento promedio en México es de 72 tons/Ha (Humbert, 1974), aunque es posible obtener más de 200 ton/Ha.

Se cuestiona si es necesario sacrificar tanta caña para la siembra, además del terreno para producirla, si consideramos que para sembrar una hectárea se requieren de 1/5 a 1/10 de Ha de planta de caña para utilizarse como semilla vegetativa (Pérez, 1990).

Otro inconveniente en la propagación tradicional de la caña es el tiempo que se tarda en producir el material de siembra, factor muy importante para la liberación de variedades mejoradas, que además puede ocasionar un proceso degenerativo debido a la continua contaminación durante su multiplicación en el campo (Lee, 1984). Por lo anterior se han ideado métodos de propagación rápida que utilizan hijuelos ya enraizados (método de Seblang); yemas axilares brotadas de la estaca en pie (método de Rayungan); yemas aisladas, tratadas con termoterapia y brotadas (Pérez y Rodríguez, 1987); estacas de una sola yema germinadas en vivero (Nayasimhom, 1985), y la micropropagación por medio de CTV.

La técnica de micropropagación, por su alto costo no puede competir contra la propagación tradicional, pero sí resulta más económica que los métodos

anteriormente mencionados, además tiene una tasa de multiplicación mucho más alta. Es por eso que resulta de gran ayuda en programas de mejoramiento y liberación de nuevas variedades, así como para rejuvenecer o incrementar el vigor de variedades antiguas. En un futuro, con el abaratamiento de dicha técnica, se podrán utilizar en las siembras comerciales plántulas obtenidas por medio de micropropagación.

En los apartados siguientes se describirán las bases teóricas de la micropropagación, así como su aplicación específica al cultivo de la caña de azúcar.

### 3.- Cultivo de tejidos vegetales.

La Micropropagación es una técnica comprendida en la rama del conocimiento conocida como Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV). Esta rama a su vez está comprendida dentro del área de la Biotecnología, la cual ha tenido grandes progresos recientemente y que, según Reinert (1977), se ha convertido en una de las áreas de investigación más dinámica y prometedora de la biología experimental. Al CTV se le podría definir como el cultivo in vitro de células, tejidos u órganos vegetales, los cuales se mantienen y desarrollan, gracias a un medio de cultivo específico.

En México contamos con el recurso humano, infraestructura y algunas instituciones de educación superior que pueden incorporar laboratorios de cultivo de tejidos a los ya existentes a un costo no muy elevado y poder obtener grandes beneficios, desgraciadamente hace falta la organización necesaria para divulgar los avances y poner en contacto a los posibles usuarios con los laboratorios que realizan esta actividad. En la actualidad los laboratorios del país que trabajan con estas técnicas, son privados con fines comerciales, o instituciones que realizan investigaciones básicas que no son utilizadas y que no están enfocadas a la solución de problemas reales.

#### 3.1 Historia.

El origen del CTV se puede remontar a 1839 cuando Schwann dijo que cada célula era capaz de desarrollarse independientemente al dársele las condiciones externas propicias, o hasta 1865 cuando Knop elaboró su solución nutritiva, la cual se sigue usando a la fecha como componente en algunos medios de cultivo.

En 1901 Morgan acuñó el término "totipotente", refiriéndose a la capacidad celular de desarrollar por regeneración un organismo completo. Para 1902 Haberlandt hizo los primeros intentos de cultivo de células aisladas pero no tuvo éxito debido a la mala selección de nutrientes en el medio y a la etapa de diferenciación de las células utilizadas (Muir, 1958).

El primer cultivo de órganos con éxito pertenece a White (1934), quien utilizó ápice radicular de tomate, le siguieron Gautheret, Nabecourt y él mismo con el primer cultivo de tejido, el cual fué realizado con zanahoria y tabaco en 1939. Van Oberbeek (1941) incluyó en su medio un nuevo componente "el agua de coco" al trabajar con embriones de zanahoria; el uso de este compuesto se difundió ampliamente; Caplin y Steward (1948) lo usaron para regenerar plantas a partir de tejido secundario del floema de zanahoria y papa, demostrando con ello la totipotencia vegetal (Krikorian, 1975).

Muir observó en 1953 la posibilidad de propagar callos fragmentados en medio líquido a través de subcultivos (Street, 1977). El CTV se desarrolló mucho a partir de la demostración hecha por Nickell (1956) de que el material vegetal podía crecer en medio líquido y tratarse como microorganismo, con este conocimiento Steward (1958) pudo descubrir la embriogénesis somática, la cual Reinert (1959) utilizaría posteriormente. Durante la década de los sesentas se demostró el potencial del cultivo de anteras en la producción de embriones haploides (Guha y Maheshwari, 1966), así como la técnica de aislamiento y cultivo de protoplastos (Cocking, 1960). Gran cantidad de nuevas técnicas se desarrollaron en los años siguientes; la utilización de distintas especies, tipos de explantes, medios de cultivo y condiciones de incubación fueron surgiendo para alcanzar diversos propósitos.

### **3.2.- Medios de cultivo.**

Los medios de cultivo juegan uno de los papeles más importantes en el CTV, debido a que los explantes son parcial o totalmente heterótrofos y los requieren para nutrirse; además, a través del medio se suministran fitohormonas exógenas con las cuales se manipula el desarrollo. Existe una gran diversidad de medios que han surgido a lo largo de la historia, para satisfacer las necesidades de las distintas especies y las intenciones de los investigadores, pero para tener una idea general bastará conocer sus componentes.

#### **3.2.1.- Componentes de un medio de cultivo.**

- 1) Sales inorgánicas. Incluye los macronutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Los iones potasio se requieren en altas concentraciones para el cultivo de ápices meristemáticos utilizados en la micropropagación de la caña (Morel, 1975). Los micronutrientes más utilizados son el hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno.
- 2) Vitaminas. Son necesarias para llevar a cabo reacciones catalíticas o metabólicas. Entre estas se encuentran la tiamina (esencial para el crecimiento celular), ácido nicotínico (niacina), piridoxina, myoinositol (estimula la morfogénesis, riboflavina (inhibe el crecimiento de raíces), ácido fólico y vitamina E (ayuda en la formación de callos y a la viabilidad de las células individuales en suspensiones).
- 3) Reguladores de crecimiento (fitohormonas). Los explantes de ápices meristemáticos requieren hormonas exógenas mientras que los brotes apicales con primordios foliares pueden ser independientes de suplementos hormonales (Shabda-Moses y Murashige, 1979). Los reguladores de crecimiento se agrupan

en cinco categorías:

a) Auxinas. Estas a su vez se clasifican en débiles (ácido indolacético AIA, ácido indolbutírico AIB y ácido indolpropiónico); medianas (ácido naftalenacético ANA); y fuertes (ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)). Las auxinas son necesarias para prevenir la diferenciación de las plántulas a partir de callos, ayudan a la expansión o alargamiento celular. No se recomienda el ácido indolacético para su utilización en caña debido a su sistema de oxidación (Pérez, 1991), además de que se encuentra en el último lugar de acuerdo a su efectividad respecto a las otras auxinas. (2,4D>ANA>AIB>AIA).

b) Citocininas. Estimulan la proliferación de los tejidos, meristemos axilares, y macollos, promueven la división celular y la organización en callos, además de inhibir la rizogénesis. Se requieren altas concentraciones de esta hormona para la formación de múltiples brotes durante la micropropagación. Las citocininas más utilizadas son: cinetina (no inhibe rizogénesis, estimula la formación de brotes y yemas adventicias); benciladenina (aumenta el ahijamiento a medida que aumenta su concentración, además de inhibir la rizogénesis); zeatina; e isopentiladenina. Según Hu y Wang (1983) la eficiencia de las citocininas se presenta en el siguiente orden: benciladenina>cinetina>zeatina.

c) Giberelinas. Estas son poco utilizadas ya que inhiben la organogénesis (en particular la rizogénesis) y muestran efectos variables según su concentración y el material al que se aplican. Promueve el alargamiento y reprime la formación de brotes en la micropropagación.

d) Ácido abscísico. Estimula la sincronización durante la embriogénesis e

inhibe el crecimiento.

e) Etileno. Es una hormona gaseosa cuyo papel aún no está bien definido. Actúa positiva o negativamente sobre la organogénesis, embriogénesis y división celular, dependiendo del explante al que se aplica y la concentración utilizada. (Pierik, 1990)

4) Aminoácidos. Proporcionan fuente inmediata de nitrógeno y su entrada al explante puede ser más rápida que en forma inorgánica o de quelato. Algunos de ellos son la arginina (estimula raíces), cisteína (agente reductor), glicina y serina.

5) Carbohidratos. Constituyen la fuente de energía y de carbono. La sacarosa y la glucosa dan los mejores resultados en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar (Nickell y Marezki, 1970). Aunque la sacarosa es la más utilizada, también se emplea la glucosa, maltosa, rafinosa, galactosa, manosa y lactosa. La concentración de este componente puede tener efectos decisivos en el desarrollo del tejido.

6) Agentes solidificantes. Representan el sistema de soporte. Los más comunes son los derivados de algas marinas (agares). También se utilizan gelatinas y gernetinas.

7) Agua. Esta debe ser bi o tridestilada y desmineralizada.

8) Suplementos no definidos. Estos son materiales cuya composición no siempre es la misma, ya que varían de acuerdo al origen. En caña de azúcar el más nombrado es el agua de coco para el crecimiento de clones y para su enraice, pero se recomienda su eliminación de los medios para proliferación debido a su alto contenido de auxinas (Krikorian, 1983). En ocasiones el extracto de malta-levadura da mejores resultados que el agua de coco (Heinz *et al*, 1977) y también son utilizados algunos otros materiales como lo pueden ser los jugos de diversas frutas y la caseína hidrolizada.

### 3.3.- Usos y aplicaciones.

En un principio el CTV fué utilizado como herramienta para el estudio de la fisiología vegetal y la biología celular o molecular; actualmente su utilidad en dicho campo sigue siendo muy amplia y se está utilizando sobretodo en el mapeo y caracterización de genes.

La conservación de germoplasma valioso, tiene gran importancia para especies con semillas recalcitrantes (café), especies de propagación vegetativa (caña de azúcar) o de difícil reproducción (cactáceas); utilizando técnicas de cultivo *in vitro* se pueden mantener dichos materiales sin exponerlos a fenómenos meteorológicos, plagas, enfermedades o contaminaciones con otros materiales, realizándose en un pequeño espacio con ambiente controlado. Su conservación puede ser a corto o mediano plazo, utilizando reguladores que limitan su crecimiento, o a largo plazo usando la crioconservación.

La producción de sustancias naturales como aceites esenciales, glucósidos, alcaloides y enzimas es otra aplicación del CTV; se pueden igualar o superar los sistemas tradicionales y se evita el problema de abastecimiento de materias primas debido a las temporadas de producción que se ven limitadas por las condiciones climáticas (Villalobos, 1985).

En el área del fitomejoramiento se pueden utilizar técnicas de CTV para obtener: variaciones como poliploidía, aneuploidía o mosaicos cromosómicos surgidas por el uso de estas técnicas; mutaciones inducidas; poliploidía inducida o por cultivo de endospermo; plantas haploides; cruza interespecíficas o intergenéricas que presenten incompatibilidad o problemas de esterilidad; fusiones de células somáticas (hibridación parasexual); etc.

La producción de haploides tiene mucho potencial en la detección de mutantes y en la obtención de plantas homocigóticas directamente en una sola

generación. Igual de importante es el cultivo de protoplastos como herramienta de gran uso en la ingeniería genética, así como el cultivo de meristemos apicales para obtener plantas libres de virus.

Otra aplicación de CTV es la micropropagación, se utiliza como valiosa herramienta para la rápida multiplicación de variedades mejoradas (como en caña), producción de clones comercialmente redituables y muchos otros usos que se expondrán con detalle en el tema siguiente.

### **3.3.1 Micropropagación**

La micropropagación es una técnica aséptica de propagación clonal bajo condiciones controladas, con la cual se asegura la calidad fitosanitaria y la uniformidad e identidad genética de las plantas que se producen. Además, esta técnica acorta al 50% o menos el tiempo convencional de propagación (Pérez, 1990), con la ventaja de poder realizarse en cualquier época del año y en un espacio relativamente pequeño.

Se justifica el uso de la técnica de micropropagación para: a) Propagar especies económicamente redituables (ornamentales, frutales o forestales); b) Propagar especies de lenta o difícil reproducción en condiciones naturales (como en el caso de la caña de azúcar); c) Obtener poblaciones genéticamente uniformes que faciliten la mecanización en el campo; d) Disponer de planta para siembra, industrialización o investigación durante todo el año; e) Obtener plantas libres de virus; f) Realizar intercambios genéticos sin barreras fitosanitarias; g) Formar bancos de germoplasma; h) Producción masiva de especies dióicas donde solo uno de los sexos es el de valor comercial (papaya, jojoba).

La utilización de brotes apicales para la rápida propagación clonal, fué primeramente utilizada por Morel (1960), durante sus estudios para la obtención de orquideas libres de virus, provenientes de plantas infectadas.

La micropropagación se puede también lograr utilizando cultivo de callos, que produzcan brotes, o a través de embriogénesis somática, pero se tiene el riesgo de que ocurran mutaciones; por lo que generalmente la técnica se realiza a través de ápices caulinares (como en el caso de la caña), los cuales forman brotes adventicios o axilares, " aunque sea tardado lo vale su uniformidad genética " (Vasil, 1980).

### **3.3.1.1.- Cultivo de ápices.**

El cultivo de ápices es la técnica adoptada para la micropropagación. El uso de dicho tejido en CTV se remonta a 1933 cuando White experimentó con brotes apicales de Stellaria media y mas tarde Loo en 1945 utilizó puntas de tallo (de 5 mm de longitud) de espárrago. A partir de entonces empezó la disyuntiva por el tamaño del explante, la respuesta a dicha disyuntiva comenzó cuando Ball (1946) encontró que era posible regenerar plantas a partir de ápices, siempre y cuando éste incluyera un mínimo de 3 primordios foliares, posteriormente Morel y Martin (1952) utilizaron ápices meristemáticos extremadamente pequeños para eliminar virus en plantas de Dahlia. Otro evento importante fué cuando Smith y Murashige (1970) tuvieron éxito con ápices sin primordios foliares.

En la actualidad se define al ápice como el conjunto constituido por el meristemo y los tejidos subyacentes sin prejuzgar sus dimensiones (Margara, 1988), ya que estos dependen de la especie y su estado de desarrollo. Al ápice se le puede llamar también punta o brote apical, pero no hay que confundirlo con el ápice meristemático, meristemo apical o meristemo, términos que normalmente se usan indistintamente, aunque estos últimos se refieren al tejido del domo meristemático encontrado en la extremidad del ápice, que es usado para la producción de plantas libres de virus y que mide tan solo 100 X 200 micras (Krikorian, 1983). Para fines prácticos se denomina ápice al explante cuya

longitud es de 1 mm o más, el cual es usado generalmente en la micropropagación y se considera meristemo a los de menor longitud (Margara, 1988).

## 4.- CTV en caña.

### 4.1.- Antecedentes

El CTV en caña de azúcar fué iniciado en 1961 por la " Hawaiian Sugar Planters Association (HSPA) " para estudiar la fisiología vegetal de la planta, para esto utilizaron tejido parenquimático y produjeron un callo que creció en medio líquido. Dicho callo fué subcultivado creando nuevos callos que después de un tiempo mostraron características diferentes. Se dieron cuenta que tenían diferente número cromosómico, y con el conocimiento de la totipotencia encontrado ya en otras gramíneas (Liu, 1988) comenzaron a trabajar en la búsqueda de subclones prometedores. En la misma década (1966) en Fidji, se utilizaron las técnicas de cultivo in vitro para sobrellevar la incompatibilidad embrión-endospermo resultado de las cruzas interespecíficas e intergenéricas (Krikorian, 1983).

La formación de brotes fué reportada por Heinz y Mee (1968), posteriormente Nickell (1969) utilizó suspensiones celulares. Marezki (1973) fue el primero en aislar protoplastos e inducir formación de callo y al año siguiente Krishnamurthi obtuvo la primer planta resistente al mosaico de la caña usando CTV. Las primeras plantas de alto rendimiento y alta concentración de sacarosa fueron resultado del cultivo de callos de Liu y Chen (1978). La regeneración de plantas haploides provenientes de anteras la hizo Chen et al durante 1979, al mismo tiempo que Vasil et al (1980) estudiaban la fijación del Nitrógeno utilizando callos. Liu y Yeh (1982) seleccionaron la primer planta de caña resistente a salinidad y posteriormente se logró formar un callo a partir de células en suspensión durante un experimento realizado por Chen y Shin (1983).

En los trabajos de mejoramiento genético tradicional se topan con la alta poliploidía, la inestabilidad y el mosaico cromosómico que se presentan en este cultivo. Por medio de CTV se produce variación somaclonal y gracias a esto se han obtenido resistencias a enfermedades causadas por Sclerospora sacchari, Helminthosporium sacchari, Ustilago scitaminea, Puccinia melanocephala y algunas por virus, como el de la enfermedad de fidji o el del mosaico de la caña (Krikorian, 1983). De la misma forma se han obtenido subclones de alto rendimiento en campo y de sacarosa, resistentes a sequía o salinidad y otros con ausencia de floración.

#### **4.2.- Técnicas comunes de CTV aplicables a la caña de azúcar.**

Todas las técnicas de CTV se pueden emplear en caña de azúcar, las más mencionadas en la bibliografía son las siguientes:

a) Cultivo de callos. El callo es una masa de células indiferenciadas que presentan una constante división celular, se obtiene a partir de cualquier parte de la planta, pero se ha reportado a la inflorescencia inmadura sin emerger como el explante que lo forma con mayor rapidez y que regenera mayor número de plantas (Liu, 1981). El cultivo de callo es mutagénico debido al tiempo que permanece in vitro y al efecto de los componentes del medio de cultivo sobre su estabilidad genética; es por eso que el cultivo de callo es usado en la generación de la variación somaclonal necesaria para la selección de subclones.

b) Cultivo de protoplastos. Por medio de procedimientos enzimáticos se pueden eliminar las paredes celulares, dejando a los protoplastos libres y en posibilidad de hacer con ellos hibridaciones parasexuales intergenéricas o interespecíficas. También se pueden realizar transformaciones genéticas a través de la ingeniería (por ej. introducción de genes de soya fijadores de nitrógeno al genoma de la caña). Una vez cumplido el objetivo, se regenerará una nueva

pared celular para que la célula pueda convertirse en una planta a través de técnicas in vitro.

c) Cultivo de anteras. Utilizando anteras inmaduras se pueden obtener plantas haploides, las cuales son el principio de una vía rápida para la formación de líneas isogénicas, las cuales son difíciles de obtener por los métodos convencionales de mejoramiento en caña, debido a la capacidad de floración que se pierde durante las múltiples autopolinizaciones.

d) Suspensiones celulares. Se utiliza en el estudio de características fisiológicas, bioquímicas y metabólicas; en la selección de subclones, principalmente en aquellos resistentes a salinidad y sequía; y en la actualidad la técnica de suspensiones celulares se está utilizando para sintetizar productos primarios y secundarios (actividad en la cual la caña es actualmente inferior a otros cultivos como el maíz, yuca y papa (Arrollo, 1988)).

e) Cultivo de ápices. Representa la mejor técnica usada en la micropropagación de caña de azúcar y en la obtención de plántulas con calidad fitosanitaria asegurada. Esta técnica fue anteriormente explicada en forma general y específicamente para la caña se describirá en apartados posteriores.

#### **4.2.1.- Micropropagación en caña a través de cultivo de ápices.**

En seguida se presentan algunos eventos significativos en la historia de la técnica de micropropagación en caña: 1) Uno de los primeros trabajos de micropropagación en caña lo realizó Meri (1971), utilizando ápices de 0.7 a 0.8 mm de longitud, teniendo como objetivo eliminar el virus del mosaico de la caña; 2) Payan et al (1977) aplicaron la técnica usando yemas axilares; 3) Waterworth y Khan con el fin de intercambiar germoplasma a nivel internacional, micropropagaron caña durante 1978; 4) Sauvaire y Galzy (1981) experimentaron con ápices caulinares para observar si existía variabilidad; 5) Hendre et al. (1983)

utilizaron ápices de 2 a 3 mm brotados de yemas tratadas con termoterapia; 6) Screenivasan trabajó con esta técnica para conservar material en la colección mundial de germoplasma desde 1985; 7) El tratamiento de estacas con agua caliente para luego utilizar sus ápices de 2 mm buscando plantas libres de virus, carbón y escaldadura foliar, fue realizado por Lee (1986).

En fechas más recientes, investigadores como Anderlinis, Kotska, Loureus, Martin, Pérez y muchos otros han seguido usando la micropropagación, encontrando que el mejor explante para ello, es el ápice. Ya que aunque se pueden usar yemas axilares, estas se contaminan con mayor frecuencia, mientras que las apicales bajo un manejo aséptico, no requieren desinfestación (Pérez et al., 1990).

La caña también se puede micropropagar a través de callos o cualquier otro tejido, pero sigue resultando el ápice el de mayor respuesta y confiabilidad en la identidad genética; a pesar de la posible aparición de variabilidad en las plantas micropropagadas mencionada por Maribona (1988). Dicha variabilidad puede venir de los métodos y medios de cultivo (se puede evitar haciendo uso de los más simples); o por la utilización de una planta quimérica como donadora (se puede evitar con selecciones individuales previas).

Por medio de la técnica de micropropagación se reporta un aumento en el rendimiento agrícola del 12 al 13% utilizando plantas micropropagadas (Anderlini y Kotska, 1986), al igual que un incremento del 5 al 30% en el número de tallos de las plantas provenientes de la micropropagación (Pérez et al., 1987).

El número de plantas obtenidas de un solo ápice varía según los autores. Mendre et al. (1983) reportan 10,000 individuos micropropagados en un año, coinciden con ellos Sauvaire y Galzy (1983). Hendre et al. (1983) mencionan la posibilidad de producir 200,000 plántulas en 6 meses y Lee (1986) escribe que se

pueden obtener hasta 400,000 en el mismo tiempo. Sin embargo debido a que una fuente de variabilidad es la edad del explante o el número de pases o subcultivos a los que se ha sometido, Revenii (1986) recomienda para caña, obtener solo 10,000 plántulas por ápice, basándose en la similitud con la micropropagación de plátano.

Son varias las fases que intervienen en el proceso de micropropagación (Fig 1), mismas que se expondrán con detalle a continuación; en forma general el mecanismo es el siguiente: Un explante (ápice) ya establecido *in vitro*, a través de las citocininas contenidas en el medio de cultivo, pierde su dominancia apical. Este fenómeno conduce a la formación de macollos provenientes de yemas axilares o adventicias; posteriormente cada brote es subcultivado ya sea para sufrir el mismo proceso o para enraizarlo y aclimatarlo, convirtiéndose en plántula lista para sembrarse. Para cualesquiera de los propósitos antes mencionados el medio de cultivo juega un papel decisivo durante el desarrollo del proceso.

#### **4.2.1.1.- Medios de cultivo utilizados en caña.**

Para la micropropagación en caña generalmente se usan variaciones del medio de White (1943), Murashige y Skoog (MS) (1962), Heinz y Mee (1969) y el de Schenk y Hildebrandt (1972), entre otros; requiriéndose uno o varios de ellos durante las distintas fases del proceso. A menudo se encuentran reportes que indican por ejemplo: " el medio de White es superior al de Murashige y Skoog para el crecimiento celular pero no para el desarrollo de la totipotencia. (Barba and Nickell 1969) ".

El medio puede ser sólido o líquido, Smith y Murashige (1970) reportaron que el medio sólido resultó exitoso para el cultivo de meristemas apicales, pero en algunos casos se tienen dificultades, como por ejemplo la oxidación que se

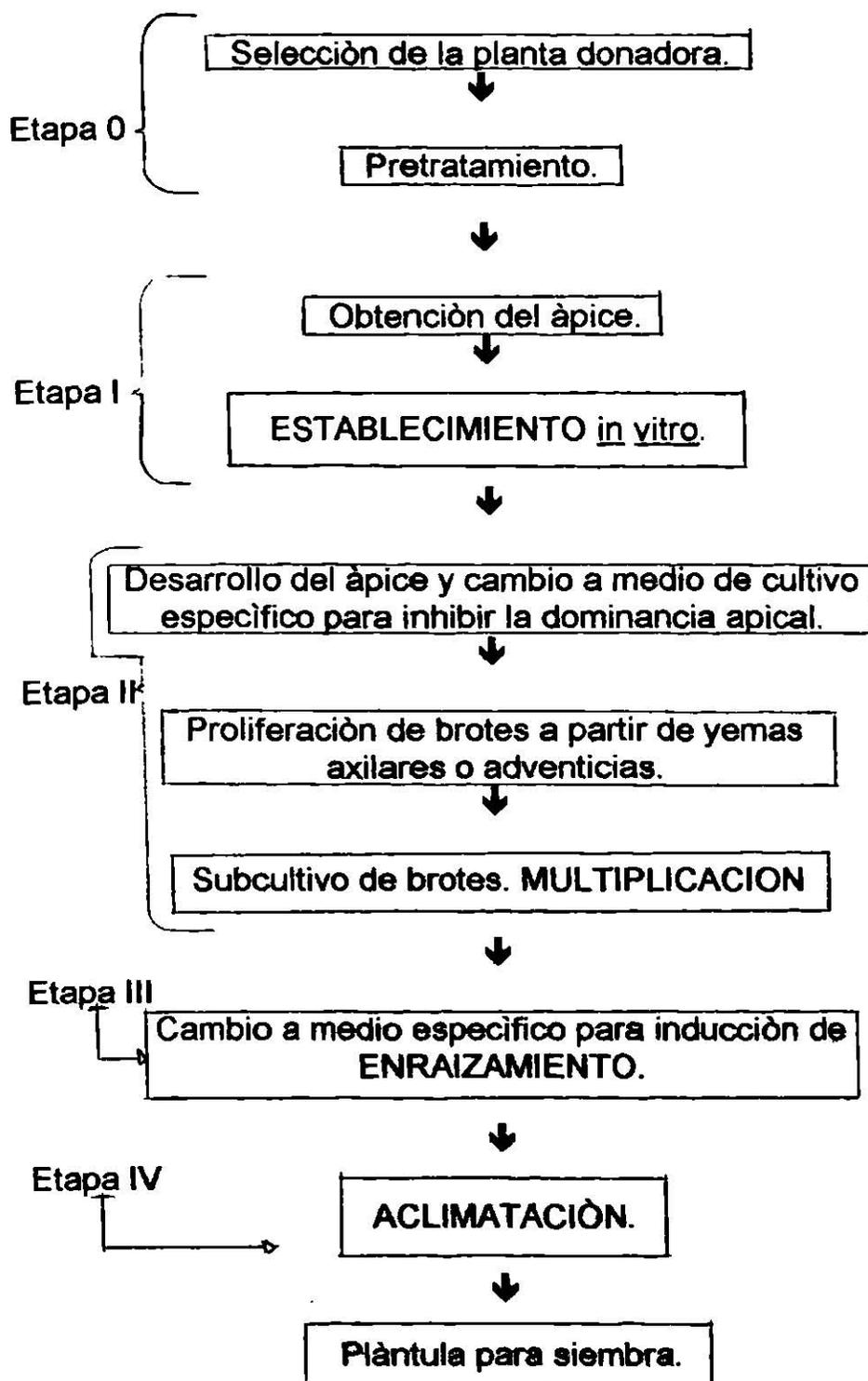


Fig 1.- Etapas de la tècnica de micropropagaci3n a trav3s de 3pices caulinares. Basado en Murashige (1974) y Krikorian (1983).

presenta en algunas variedades para lo cual se puede emplear la técnica usada por Goodwin (1966), quien utiliza medio líquido con puente de papel filtro.

#### **4.2.1.2 Fases de la micropropagación.**

Como ya se ha mencionado, la micropropagación de la caña de azúcar es comúnmente realizada a través del cultivo de ápices; cada centro de investigaciones utiliza una metodología semejante, pero con diferencias en cuanto a los medios de cultivo, tamaño del explante, esterilización, etc. Para entender la técnica, se ha dividido en cuatro fases (Fig 2), mismas que traslapan u omiten algunos autores. Dichas fases se exponen a continuación.

**4.2.1.2.1.- Establecimiento.** En esta etapa se selecciona la planta madre, se esteriliza, se obtiene el explante y se le coloca en un medio específico para que obtenga un determinado crecimiento.

La selección de la planta donadora es importantísima, ya que sus características serán transmitidas a toda una gran población, por ello no solo hay que observar su fenotipo sino también su genotipo a través de pruebas de progenie. Murashige (1974) propone un pretratamiento a la planta donadora con fumigantes y fertilizantes, a esto le llamó etapa cero y sirve para asegurar el vigor y la calidad fitosanitaria del material vegetativo. Se recomienda que la edad de la planta sea de seis a ocho meses (Heinz et al., 1977), aunque se pueden utilizar plantas de cualquier edad siempre y cuando no sean muy viejas.

Escogida la planta se procede a obtener la parte apical del cogollo para poder desinfectarla, su tamaño se reduce a los primeros tres o cuatro centímetros partiendo del meristemo apical cortando con un cuchillo al principio y retirando hoja por hoja posteriormente, con cuidado de no quebrar el delicado ápice. Obtenidas estas secciones se desinfectan sumergiéndolas en alguna de las siguientes soluciones:

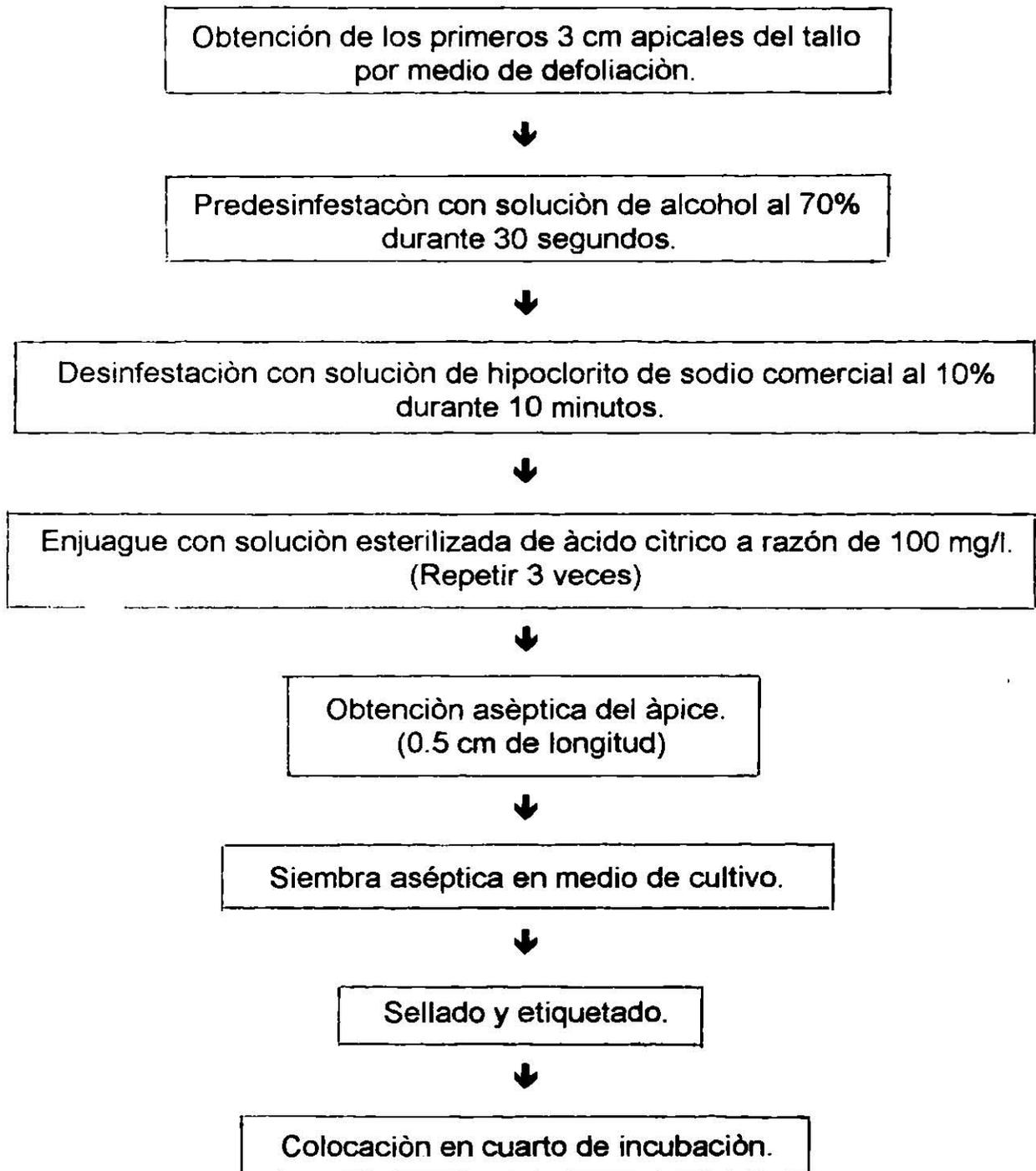


Fig 2.- Metodología utilizada en la fase de establecimiento durante la micropropagación de la caña de azúcar.

- a) alcohol al 70% (v/v) durante un minuto y después 20 minutos en hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v) (Lee, 1986);
- b) agua oxigenada al 12% (v/v) durante 10 minutos (Universidad Central de Las Villas (U.C.L.V.) Santa Clara, Cuba, 1990);
- c) cloro al 3% (v/v) y cloruro mercurico al 0.1% (v/v) (Méndez, 1993).

Ya esterilizada la sección y frente a la campana de flujo laminar, se siguen removiendo con la ayuda de pinzas y bisturí las hojas que todavía contiene hasta obtener un ápice de 5 a 15 mm (U.C.L.V., 1990), 0.7 a 0.8 mm (Meri, 1971), 2 a 3 mm (Hendre, 1983), o 2 mm (Lee, 1986). Esto depende de la variedad de la caña y la habilidad del investigador.

Lee (1986) maneja otra técnica en la cual obtiene sus ápices, de brotes provenientes de puntas de caña esterilizadas en hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v) durante 40 minutos e incubadas por 20 a 30 días en vermiculita a 30° C, las cuales han obtenido un crecimiento de 20 a 25 cm de altura. A dichos brotes se les extrae el ápice y se les esteriliza de la forma antes mencionada.

El ápice es colocado en un medio sólido o en uno líquido. No se consigna diferencia de respuesta hacia alguna de estas condiciones (Shukla, 1994), pero la más utilizada es la de medio líquido.

Los medios de cultivo utilizados en esta fase varían según el autor pero, todos son modificaciones de medios anteriormente mencionados con variantes en el tipo y cantidad de reguladores de crecimiento y ausencia o presencia de aminoácidos y otros suplementos de composición no definida. Por ejemplo, la U.C.L.V. utiliza las sales del medio MS (1962) con las vitaminas de Heinz y Mee (1969) adicionado con 0.3 mg/l AIA, 0.8 mg/l kinetina, 0.002 mg/l AIB y 10 % (v/v) de agua de coco. Shukla (1994) reporta éxito con medio MS y 0.5 mg/l BAP, cinetina y AIB; por otro lado Hendre (1983) añade al medio MS 0.1 mg/l de ácido

giberélico, 0.01 mg/l AIB y 5% (v/v) de agua de coco. De la misma forma Screenivasan (1985) y Krikorian (1983) utilizan el medio de White, añadiéndole el primero 1 mg/l AIB, 2 mg/l de glicina; mientras que el segundo 1 mg/l de AIB y 1.07 mg/l de cinetina, coincidiendo ambos en usar 0.5 mg/l de ácido giberélico y 10% (v/v) de agua de coco.

El ápice, aunque en menor grado que las yemas, también sufre oxidaciones, debido a la presencia de polifenoles; esta oxidación inhibe el crecimiento, por lo que Heinz (1977) propone enjuagar los explantes en una solución con 100 mg/l de cisteína durante un minuto, y además añadir 50 mg/l de cisteína al medio para que actúe como agente reductor y evitar así el problema, también se puede utilizar 0.06% de polivinyl pyrrolidone en el medio (Shukla, 1994). En la Universidad de Texas A&M en Estados Unidos cambian el medio diariamente para evitar dicho oscurecimiento (Comunicación personal Biol. M. Campos, investigador de Texas A & M), mientras que la U. C. L. V. en Cuba propone colocar de modo invertido el explante para obtener una reducción en la oxidación (Comunicación personal Dr. Pérez Ponce, investigador de la U.C. L.V.).

Tanto en esta fase como en la siguiente, existen condiciones de incubación que varían de 1000 a 3000 lux de intensidad lumínica, 24 a 30°C de temperatura y 14 a 18 horas luz al día (Liu, 1986; Lee, 1986; Walker, 1981; Méndez, 1994) aunque estas características en la micropropagación comercial dependen de las posibilidades económicas del laboratorio.

Ya establecido el explante tardará de 25 a 30 días para obtener una altura aproximada de 5 cm (Lee, 1986), que es la altura óptima para continuar con la siguiente fase.

**4.2.1.2.2.- Ahijamiento.** Se le llama también etapa de proliferación o multiplicación y es en ella donde se rompe la dominancia apical de la planta

establecida, con el objetivo de obtener un macollo de brotes axilares y adventicios, que posteriormente se separarán a nuevos recipientes. El medio líquido es el mejor para esta fase ya que provee una tasa de multiplicación mayor (Heinz, 1977). La mayoría de los autores coinciden en partir del medio MS, haciendo modificaciones particulares como la adición de: a) 0.1 mg/l de AIA, 2 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de cinetina (Shukla, 1994); b) 6 BAP 0.1 mg/l o 6 BAP 0.624 mg/l y ANA 0.025 mg/l (Heinz et al., 1977); c) 0.1 mg/l de cinetina, 0.2 mg/l de BAP y 0.05 mg/l de biotina (Méndez, 1994). El agua de coco y el AIA son perjudiciales en esta etapa (Krikorian, 1983), así como las dosis altas de 6 BAP, las cuales producen muchas plántulas, pero de pequeño tamaño y difícil enraizamiento. (Heinz et al., 1977)

Una vez alcanzada la altura óptima, las plántulas se colocarán en número de 5 ó 6 en una caja magenta conteniendo 35 ml de medio o en matraces Erlenmayer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio. Cada explante producirá brotes que serán subcultivados a los 30 días, para seguir produciendo más brotes que de ahora en adelante serán subcultivados cada 15 días. Por lo tanto, a un explante se le practicarán en promedio 4 o 5 pases o subcultivos, teniendo un coeficiente de ahijamiento de 10 plántulas por pase (UCLV, 1990). Su tasa de multiplicación por pase varía del 12 al 22% de acuerdo al genotipo y a la edad del explante in vitro (Lee, 1987), la óptima es del 19% pero, debido a la contaminación se reduce al 16.4% (Walker, 1993).

A medida que aumenta el número de pases, aumenta consigo la tasa de multiplicación, por la formación de multiyemas (Pérez, 1989), sin embargo no se recomienda obtener mas de 10,000 plántulas por explante (4 o 5 pases), para no inducir posibles mutaciones.

Al pensar en una multiplicación comercial, se deben escoger los medios y condiciones de incubación que produzcan al mas bajo costo cada plántula, por ejemplo una buena tasa de multiplicación se obtiene con solo 2 ó 3 explantes por recipiente, pero sería muy alto el costo debido al manejo, a la cantidad de medio, envases y espacio utilizados; por lo que se aumenta a 6 u 8 explantes por recipiente, aunque se tenga una menor tasa de multiplicación.

Algunos modelos propuestos son el de la Hawaiian Sugar Planters Association y el de la U.C.L.V. El primero utiliza cajas magenta (GA7) con 35 ml y 8 explantes en cada una, cada hombre transplanta 5.7 cajas y producen con ello 20.4 nuevas cajas. Aún teniendo una contaminación del 10 al 25% se producen 3140 plantas de un solo explante después de 7 generaciones (Walker *et al.*, 1993). El segundo utiliza frascos con 5 plantas cada uno, deja para ahijamiento el 10% y enraizan el 90% restante. Cada planta produce 3 hijos y como cada persona maneja 100 frascos en un día, se obtienen 1350 plantas por hombre en un día. (90 frascos X 5 plantas X 3 hijos = 1350 plantas) (U.C.L.V., 1990).

**4.2.1.2.3.- Enraizamiento.** La mayoría de los autores consigna un deficiente enraizamiento en la caña de azúcar *in vitro* (Heinz *et al.*, 1977), debido a que las plántulas provienen de medios con citocininas que lo inhiben. Durante esta fase las plántulas (de 3 a 5 cm) provenientes del ahijamiento se separan, se elimina el tejido necrosado y son colocados en medios líquidos como el de Schenk y Hildebrandt modificado, el de Heinz y Mee al 50% con 5 g/l de carbon activado y 9% de sacarosa o el MS con 9% de sacarosa y sin agua de coco (Heinz *et al.*, 1977), MS con 5 mg/l de ANA y 5% de sacarosa (Shukla, 1994), MS al 50% con ANA 0.02mg/l, BAP 0.02 mg/l y 0.05 mg/l de giberelinas (Méndez, 1993) o el MS sin vitaminas de Heinz y Mee, AIA 1.3 mg/l y 4% de sacarosa (Pérez, 1991). Se

recomienda una temperatura de 15° y luz difusa como condiciones de incubación durante esta fase (Lee, 1986).

Una vez que los primordios foliares se hayan desarrollado o las plántulas tengan una altura de 6 a 9 cm aunque aún no hayan enraizado, se pasarán a la siguiente etapa, la aclimatación.

**4.2.1.2.4.- Aclimatación.** Esta fase también es conocida como endurecimiento, dura de 20 a 60 días, según el material y las condiciones en que se realice. En la U.C.L.V. se podan las hojas de las plántulas, se dejan 4 días en agua destilada y se pasan a almácigos con tierra preparada y sombra durante 10 a 15 días, para llevarlo al terreno definitivo después de 6 a 8 semanas, realizando una subdivisión si ésta es posible. También se propone primero una estancia en vermiculita, dándoseles riegos con solución al 0.5% del medio para enraizar. Cuando tienen de 15 a 18 cm se llevan a un almácigo de tierra suave, donde pasan 4 ó 6 semanas (Liu, 1982). Un sustituto de la vermiculita utilizada por Liu, es una mezcla de agrolita y germinasa en relación 3:1, y cubiertos con plásticos durante 20 días en invernaderos (Méndez, 1993). Las plántulas endurecidas se trasplantan a terreno definitivo a distancias de 35 cm entre plantas y 1.37 m entre hileras (Liu, 1982).

#### **4.2.2.- Micropropagación de caña a través de cultivo de callos.**

Esta técnica no compite contra la micropropagación que utiliza como explante a los ápices debido a la menor tasa de multiplicación y a la posibilidad de que ocurran mutaciones; sin embargo es necesario conocer la técnica a grandes rasgos debido, al uso que se le da en diversos campos de la investigación y para efecto de poder compararla con la técnica antes mencionada.

Para la formación de callo, se puede tomar cualquier tejido u órgano de la caña pero la mayoría de los autores (Barba et al, 1969; Heinz et al, 1977; Liu,

1983) coinciden en mencionar a la inflorescencia inmadura sin emerger como el mejor material. Los medios más utilizados son el de Payan y Tarcon, y el de Murashige y Skoog, ambos modificados y con adiciones de agua de coco y 2,4-D (Heinz *et al.*, 1977).

Se observa la iniciación del callo a los 4 días de establecido el explante y a las 4 ó 5 semanas se forma un gran callo (Liu, 1983), éste se subdivide colocándose en el medio antes mencionado para seguir formando callo o en otro distinto para continuar a la etapa de diferenciación. El medio para la diferenciación contiene ácido naftalenacético, cinetina y agua de coco, los cuales ocasionan la aparición de meristemoides, que dan lugar a brotes apicales. Se pueden obtener de 20 a 35 plántulas por tubo de ensaye (de 30 X150 mm) en cada pase (Liu, 1983). Estas se pasan a un medio para enraizar, sobreviviendo solo un 70% de los clones aproximadamente (Heinz y Mee, 1969). Posteriormente se someten a una aclimatación para prepararlos a la siembra definitiva.

## **5.- Trabajo práctico de la fase de establecimiento in vitro en caña de azúcar.**

El trabajo consistió en la realización de la fase de establecimiento aséptico en la micropropagación de caña de azúcar utilizando ápices caulinares. Este se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (F.A.U.A.N.L.). Se estudió la respuesta al cultivo in vitro, de las siguientes variedades de caña de azúcar: MEX 68-1345, MEX 68-1347, CP 72-2086, MEX 5532, Q 68 y CO 997.

### **5.1.- Descripción de la metodología utilizada.**

Las variedades utilizadas fueron obtenidas en la localidad de Pánuco, Veracruz, en Marzo de 1995. Para facilitar el transporte de las plantas se eliminó la parte basal del tallo, dejando solamente el cogollo (punta de tallo) y los 4 entrenudos proximales visibles (fig 3). En el "área de trabajo" del laboratorio se extrajo el ápice caulinar sometiendo a los cogollos a un proceso de eliminación de las hojas envolventes y porción basal del tallo, hasta reducirlo a un segmento de 3 cm, incluyendo el ápice mencionado.

#### **5.1.1.- Preparación de medios de cultivo.**

Los medios de cultivo utilizados fueron el de Murashige y Skoog (MS 1962) modificado por Taylor et al., (1993) y el de White (1943) modificado por Screenivasan y Screenivasan (1985). Ambos medios fueron preparados utilizando las sales inorgánicas y los compuestos orgánicos que se muestran en el cuadro 1 y se estandarizaron a un pH de 5.7.

El "agua de coco" utilizada en la composición de ambos medios fue extraída de cocos maduros, calentada a 50°C durante 10 minutos y filtrada, para posteriormente refrigerarla hasta el momento de preparación del medio.

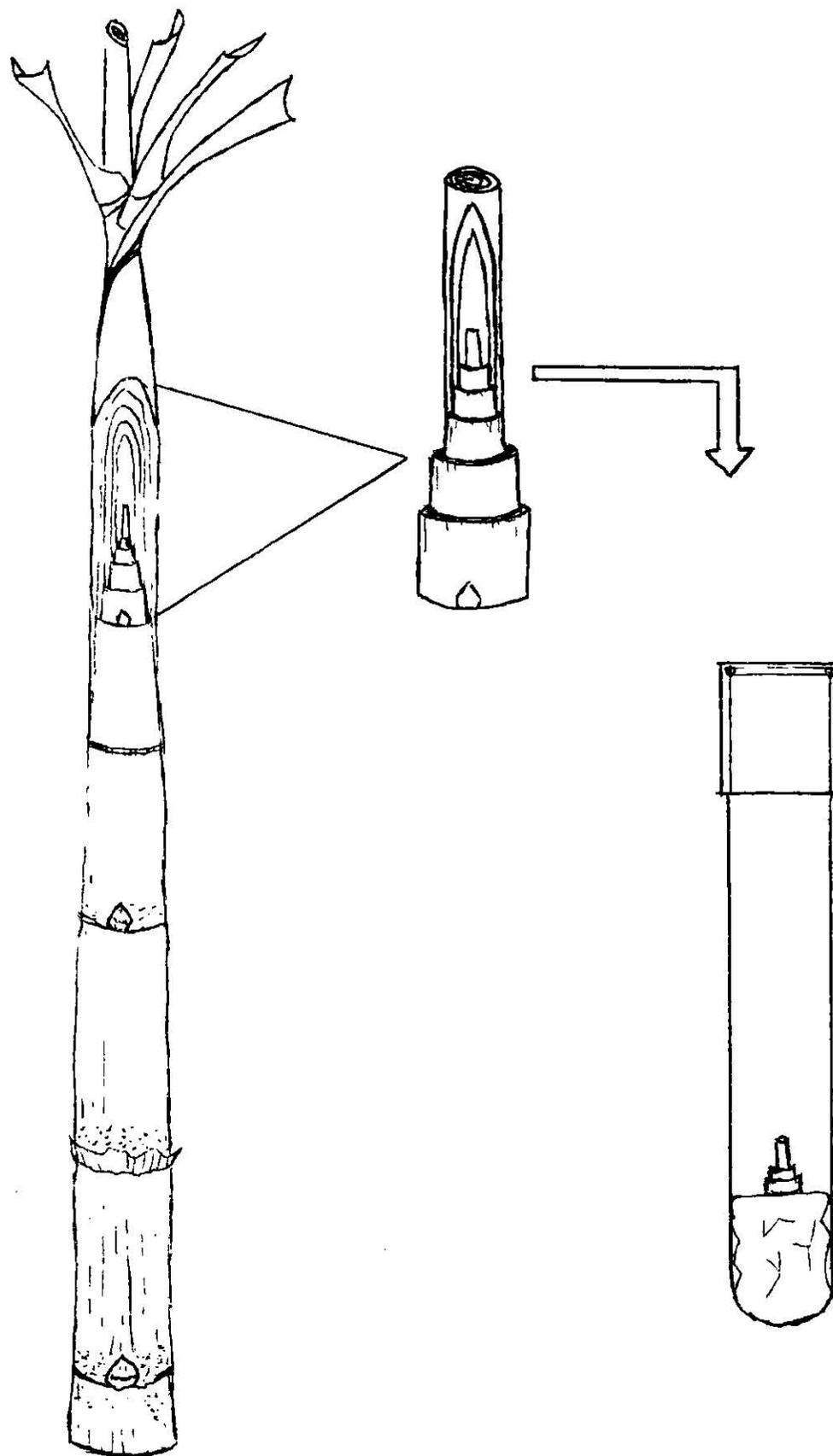


Fig 3.- Obtención del ápice caulinar a partir del cogollo o punta de tallo.

COMPONENTES	MEDIO DE CULTIVO	
	M.S. (1962)	White (1943)
<b>Sales inorgánicas</b>		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	720
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	1.5
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	3.0
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.9	5.3
KI	0.83	0.75
Ca(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	-----	300
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-----	200
KCl	-----	80
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	16.5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-----
KNO <sub>3</sub>	1900	-----
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	-----
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-----
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3	-----
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	-----
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	-----
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.25	-----
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.25	-----
<b>Compuestos orgánicos</b>		
Glicina	2.0	2.0
Piridoxina	0.5	-----
Ac. Nicotínico	0.5	-----
Tiamina	0.1	-----
Myo-inositol	100	100
Cinetina	0.1	1.07
Ac. indolacético (AIA)	-----	0.1
Ac. giberélico	-----	0.5
Bencil aminopurina (BAP)	0.2	-----
Sacarosa	20000	20000
Agua de coco	5% (v/v)	10% (v/v)

Cuadro 1.- Medios de cultivo utilizados (componentes y cantidades).

Se vertieron 10 ml del medio MS a cada tubo de ensaye (20 X 150 mm) y se les colocó en su interior un puente de papel filtro como soporte. Los tubos se cubrieron con una tapa de polipropileno transparente y fueron sometidos a esterilización (30 minutos a 1 atmósfera de presión en autoclave eléctrica).

El medio de White incompleto (sin ácido giberélico) fue esterilizado bajo las condiciones anteriormente mencionadas. El ácido giberélico por ser termolábil y no haberse podido incorporar previamente a la esterilización, fue filtrado por medio de ultra filtro millipore dentro de la campana de flujo laminar para posteriormente añadirlo al medio. En condiciones asépticas se vertieron 10 ml del medio de White completo a cada tubo de ensaye y se les colocó su puente de papel filtro y tapón correspondiente.

#### **5.1.2.- Desinfestación.**

Los segmentos de 3 cm fueron desinfestados primeramente en una solución de etanol (70% v/v) durante 30 segundos y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio comercial (0.6% de ingrediente activo) durante 10 minutos. En condiciones asépticas (en el interior de una campana de flujo laminar), los segmentos desinfestados fueron enjuagados 3 veces con una solución esterilizada de ácido cítrico (100 mg/l) para disminuir la oxidación. Ya enjuagados se mantuvieron en agua destilada esterilizada para evitar su deshidratación.

#### **5.1.3.- Establecimiento in vitro.**

Con ayuda de pinzas y bisturí se realizaron cortes laterales y transversales con cuidado de no eliminar el meristemo. Mediante esta práctica se removieron primordios foliares y porción de tallo hasta reducir el segmento a 5 mm de longitud (fig 3), constituyendo así el explante que fue colocado en cada uno de los tratamientos correspondientes.

En condiciones asépticas y mediante el uso de pinzas se destapó cada tubo de ensaye y caja magenta para introducir en su interior el explante correspondiente. Posteriormente se selló y etiquetó cada tratamiento y se trasladó al área de incubación, cuyas condiciones eran: temperatura de 25°C, 16 horas luz al día y una intensidad lumínica proveniente de 3 focos de luz blanca de 75 Watts colocados a 30 cm de los recipientes.

Se establecieron un total de 86 explantes de las diversas variedades. La cantidad de explantes por variedad fueron distribuidos según el medio de cultivo y el contenedor utilizado tal como se muestra en el cuadro 2.

<u>Medio de cult.</u> Variedad	TUBOS DE ENSAYE		CAJAS MAGENTA	
	Medio MS	Medio White	Medio MS	Medio White
MEX 68-1345	6	8	1	3
MEX 68-1347	7	5	2	
CP 72-2086	8	8	2	1
MEX 5532	7	7	1	
Q 68	7	4		
CO 997	7	3		

Cuadro 2. Explantes establecidos por variedad según el medio de cultivo y el contenedor utilizado.

Los contenedores utilizados fueron tubos de ensaye con puente de papel filtro y cajas magenta (GA7). Se utilizaron estas últimas para comparar el comportamiento del explante establecido en ellas respecto a aquél establecido en tubos de ensaye. La caja magenta esterilizada llevaba en su interior 10 ml de medio de cultivo, cantidad suficiente para cubrir 1/3 de la altura del explante.

Las variables evaluadas para determinar la respuesta de las diversas variedades al cultivo in vitro fueron:

- a) Longitud del brote apical. Se midió la distancia desde el borde en donde se encontraba originalmente el domo meristemático, hasta el borde superior del brote apical.
- b) Grado de oxidación. Se estableció cualitativamente una escala numérica de acuerdo a la acentuación del color café de los explantes. Los valores se asignaron de acuerdo al criterio del observador.

## **5.2.- Resultados.**

### **5.2.1.- Longitud del brote apical.**

En las cajas magenta los explantes aumentaron sus dimensiones respecto a los análogos de cada variedad colocados en tubos de ensaye con puente de papel filtro.

En ambos medios la variedad CP 72-2086 obtuvo la máxima longitud, desarrollando un brote apical de 1 a 1.5 cm. Algunos explantes de dicha variedad colocados en medio de White desarrollaron una masa celular (callo) en su parte basal. El resto de las variedades mantuvieron su tamaño original, a excepción de la MEX 5532, la cual alcanzó un crecimiento de 2 mm en algunos explantes.

Basándose en el comportamiento de la variedad con mayor respuesta (CP 72-2086), los explantes establecidos en medio de White modificado obtuvieron el mayor crecimiento, respecto a aquellos colocados en medio MS..

### **5.2.2.- Grado de oxidación.**

Todas las variedades presentaron oxidación, sin embargo la variedad MEX 68-1347 fue la que obtuvo el menor grado de oxidación. En general, los explantes colocados en medio de White tuvieron un menor grado de oxidación al compararlos con los explantes de la variedad análoga establecidos en medio MS.

Al comparar variedades análogas con igual medio pero en diferentes contenedores, se presentó un menor grado de oxidación en aquellos tratamientos colocados en cajas magenta.

### **5.3.- Conclusiones y discusiones.**

#### **5.3.1.- Longitud del brote apical.**

Los explantes colocados en medio de White obtuvieron un mayor crecimiento que aquellos establecidos en medio MS. Lo anterior no concuerda con Krikorian (1983) quien comparando ambos medios recomienda al MS. La diferencia de la respuesta puede explicarse parcialmente a los distintos reguladores de crecimiento utilizados en los medios; principalmente el ácido giberélico presente en el de White, el cual es utilizado para promover el alargamiento celular *in vitro* (torres, 1989). Otra causa puede ser la mayor cantidad de agua de coco presente en el medio de White, la cual promueve crecimiento y división celular (Pollard, 1961; Lethan, 1974), pudiendo interactuar con las auxinas para ello (Krikorian, 1983).

La causa por la que los explantes obtuvieron un crecimiento superior en las cajas magenta podría deberse a que en ellas se mantiene un mayor contacto del explante con el medio de cultivo, permitiendo así una mejor asimilación de los nutrientes. Además en estos recipientes queda contenida una mayor cantidad de aire disponible para los intercambios gaseosos.

El genotipo influye determinadamente en la respuesta a la técnica de micropropagación (Pérez *et al*, 1991), es por ello que podemos asumir que la variedad CP 72-2086 tuvo la mejor adaptación a la técnica al compararse su crecimiento respecto a los demás genotipos utilizados.

Por otro lado, la oxidación afecta al crecimiento (Shukla, 1994) y ésta se presentó en mayor grado en los explantes establecidos en medio MS, pudiendo ser esta la causa del menor crecimiento de los explantes.

### 5.3.2.- Grado de oxidación.

La oxidación observada en todas las variedades, se puede deber a los cortes laterales practicados a los explantes. Generalmente dichos cortes no se recomiendan debido a que ponen en contacto con el oxígeno las sustancias fenólicas contenidas en los explantes, produciéndose la oxidación (fenolización). Krikorian (1983) señala que la fenolización depende del genotipo, es por ello que algunas variedades presentaron mayor grado de oxidación que otras.

En el medio de White los explantes se oxidaron en menor grado. Una causa pudo ser la mayor cantidad de agua de coco presente en dicho medio, comparado con el medio MS; otra causa puede ser la mayor cantidad de nitratos en el medio MS, los cuales pueden provocar oxidaciones (Pierik, 1990), otro factor podría ser el AIA, cuyo sistema de oxidación (Pérez, 1991) pudiera haber afectado a los explantes en medio MS ya que contenía una mayor cantidad de este regulador del crecimiento.

En el medio MS se añadieron por error las vitaminas contenidas en la solución "G" (piridoxina, ácido nicotínico y tiamina), las cuales pudieron provocar una mayor oxidación, tal como sucede en el caso de violeta africana. En dicho caso la adición de las vitaminas mencionadas produjeron una oxidación, lo cual no sucede cuando se agrega solamente la tiamina (comunicación personal Dra. Elizabéth Cárdenas catedrática e investigadora de la F.A.U.A.N.L.)).

El menor grado de oxidación presentado en las cajas magenta se puede explicar a una mayor dilución de las sustancias fenólicas en el medio, lo cual en el caso de los tubos de ensaye no sucede, ya que dichas sustancias quedan retenidas en el puente de papel filtro.

## 6.- Bibliografía.

1. Arrollo V, G. 1988. Biotecnología ¿Una salida para la crisis agroalimentaria? Editorial Plaza y Valdez. Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp 327-355.
2. Copping, L.G. and P. Rodgers 1985. Biotechnology and its application to agriculture. Editorial BCPC. Gran Bretaña. 165 pp.
3. Dodds, J.H. and L.W. Roberts 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. New York. 178 pp.
4. Heinz, D. J., M. Krishnamurthi, L.G. Nickell and A. Marezki 1977. Cell, tissue, and organ culture in sugarcane improvement. In: Plant cell, tissue and organ culture. J. Reinert (ed). Editorial Springer-Verlag. Nueva York . pp 3-17
5. Humbert, R. P. 1974. El cultivo de la caña de azúcar. Editorial Continental. México. 720 pp.
6. Jimenez G.,E., J.Pérez, O. Velazco e I.Herrera O. 1990. Micropropagación in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum sp.* híbrido) Centro Agrícola, Año 17 No.1, Enero- Abril.
7. Kartha, K.K. 1975. Meristem culture. In : Plant tissue, culture methods. O.L. Gamborg and L.R. Wetter (eds). National Research Council of Canada. p.42.
8. Khan, A.Q. and R. Shukla. 1994. In vitro clonal propagation of sugarcane. Sugarcane No.4 pp 21-23
9. Krikorian, A.D. 1991. Caña de azúcar. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. W.M. Roca y L. A. Mroginski. (eds). Centro Internacional de Agricultura tropical. Colombia. pp 544-569.

10. Lee, T.S.G. 1986. Multiplication of sugarcane by apex culture. Turrialba Vol 36 No.2 Abril-Junio. pp 231-236.
11. Lee, T.S.G. 1987. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum sp.*) Plant cell, tissue and organ culture. Vol 10, No.1. pp 47-55.
12. Liu, M.C. 1978. In vitro methods applied to sugarcane improvement. en: Plant Tissue Culture. Editado por T.A. Thorpe. Academic Press. E.U.A. pp 299-323.
13. Liu, M.C. 1984. Sugarcane. In: Handbook of plant cell culture. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds). Vol No.2. Editorial Macmillan. Nueva York. pp 572-605.
14. Lozoya S, H. 1985. Micropropagación vegetal. Ciencia y desarrollo Vol XI, No.65. pp 63-70.
15. Malhotra, S.D. 1994. Biotechnology and sugarcane. Sugarcane No.3. p 4.
16. Marezki, A. 1987. Sugarcane improvement through breeding. In: Tissue culture, its prospects and problems. D.J. Heinz (ed). Elsevier Science Publishers Co. Nueva York. pp 343-377.
17. Méndez, S. R. 1994. Micropropagación de caña de azúcar a través de yemas y ápices. En: Memorias del X Congreso de la Sociedad Mexicana de Fotogenética. México. p. 127.
18. Payan, F., H. Carmen y G. Tascón 1977. Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) Acta agronómica Vol 27. Universidad Nacional de Colombia. pp 43-79.
19. Pérez P., J., O. Velazco y E. Jimenez G.. 1990. Micropropagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum sp.* híbrido). Centro Agrícola. Año 17, No.1 Enero-Abril. pp 2-16.

20. Pèrez P, J. 1988. Perspectivas, resultados y recomendaciones para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum sp.* híbrido). Sin publicar. Universidad Central de Las Villas, República de Cuba. 22 pp.
21. Stevenson, G.C. 1965. Genetics and breeding of sugarcane. Editorial Longmans, Green and Co LTD. Gran Bretaña. pp 28-32.
22. Torres, K. 1988. Tissue culture techniques for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold. New York. p 34.
23. Villalobos, V. M. 1985. Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Colegio de Postgraduados de Chapingo. México. 230 pp.
24. Walker, P.H., J.P. Harris and L.D. Gautz. 1993. Optimizing sugarcane micropropagation. Applied engineering in agriculture.. Vol 9 (3): 327-334.
25. Walker, P.H. and P. J. Harris. 1991. Optimal environment for sugarcane micropropagation. Transactions of the ASAE Vol 34 (6): 2609-2614.

FOLIO

1815

1815

T  
S  
O  
C