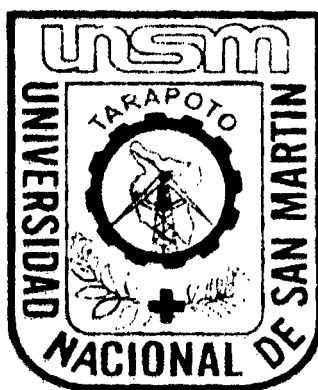


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**



**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LA PROPAGACIÓN  
IN VITRO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*) A  
PARTIR DE MERISTEMOS.**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE.  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:  
FRANCISCO ARÉVALO ARMAS**

**TARAPOTO - PERÚ  
2005**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL**

**AREA DE BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE  
CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*) A PARTIR DE MERISTEMOS**

**PRESENTADO POR: BACH. FRANCISCO AREVALO ARMAS**

**Blgo. Msc. Winston Ríos Ruiz**  
Presidente

**Ing. Darío Maldonado Vásquez**  
Miembro

**Ing. Javier Ormeño Luna**  
Miembro

**Ing. Elías Torres Flores**  
Asesor

**Bach. Francisco Arévalo Armas**  
Tesisista

**TARAPOTO - PERÚ**

**2005**

## DEDICATORIA

*A DIOS por la vida...*

*Con todo cariño, respeto y amor  
A mis padres FRANCISCO  
ARÉVALO y MERCEDES ARMAS,  
por el impulso que me brindan en todo  
momento para salir adelante en mi vida.*

*A KARINA, JEAN, por  
estar siempre conmigo.*

*A mis queridos abuelos, tíos y  
primos que siempre me brindan su  
apoyo en todo momento.*

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional de San Martín, por mi formación profesional.
- ❖ Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Convenio INIA-UNSM, por la oportunidad brindada en la ejecución de la tesis.
- ❖ Al Ing. **Elías Torres Flores** por ser Asesor de la presente tesis
- ❖ Al Biólogo **Marco Antonio León Martínez**, maestro y amigo.
- ❖ A mis colegas y amigos: **Obdulio Barrera, Segundo Amasifuén, Henri Haya, Tito Rojas, Roger Aly Gálvez, Jim Dickerson, Juan Arévalo y Luís Mendo** por haberme brindado su amistad y sugerencias en el presente estudio.
- ❖ A todos mis **maestros**, a quienes considero como pilares para mi formación en mi vida profesional.

# INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
V. RESULTADOS	38
VI. DISCUSIONES	45
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. RECOMENDACIONES	54
IX. RESUMEN	55
X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.	57
XI. ANEXO	60

## I. INTRODUCCIÓN.

La problemática de la producción de cultivos, implica específicamente el manejo agronómico para una satisfactoria rentabilidad de la producción para el que lo produce. En este ámbito, está enmarcado el problema fitopatológico de los cultivos y su manejo adecuado.

La propagación comercial de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) se realiza asexualmente, mediante la siembra de esquejes, garantizando la regeneración de plantas exactas a la planta madre. En este sentido, el cultivo de tejido meristemático *In Vitro* se presenta como una posibilidad de propagación asexual en forma acelerada y de un excelente estado sanitario, convirtiéndose además, en una herramienta útil para el mejorador.

Esta técnica se aplico a caña de azúcar por primera vez, posteriormente se ha utilizado, tanto para la propagación acelerada de las plantas, como para la obtención de plantas libres de patógenos, especialmente virus.

El Perú muestra buenos niveles de productividad, variedades de caña altamente resistentes a plagas y privilegiadas condiciones ecológicas que constituyen razones suficientes para la reactivación y el impulso de la agroindustria por sus grandes ventajas comparativas.

Debido a la demanda que siempre se genera para la obtención de material de propagación certificado, se elaboró el desarrollo de metodologías de micropropagación *In Vitro* a partir de meristemas, donde se destaca un protocolo de propagación para la variedad puesta en estudio 'Azul Casa Grande' y así obtener plántulas de una alta calidad fitosanitaria y de crecimiento rápido.

## II. OBJETIVOS.

- 2.1. Desarrollar un protocolo eficiente para la diferenciación de meristemas en cultivo *In Vitro* de caña de azúcar variedad 'Azul Casa Grande'.
- 2.2. Evaluar la eficiencia de los medios de cultivos propuestos para la inducción y diferenciación de los meristemas.



### III. REVISION BIBLIOGRAFICA

#### 3.1. BOTÁNICA DE LA CAÑA DE AZÚCAR.

**HELGFOHG S. (1 992)**, menciona que, la caña es una gramínea del género *Saccharum*, originaria de Nueva Guinea, cultivada en zonas tropicales y subtropicales, su reproducción es agámica y sus raíces muy ramificadas. Su forma es erecta con tallos cilíndricos de 2 a 5 metros de altura, diámetro variable de 2 a 4 cm y nudos pronunciados sobre los cuales se insertan alternadamente las hojas delgadas.

##### 3.1.1. TAXONOMÍA.

**BOTTA (1 990)**, sugiere el siguiente esquema como clasificación taxonómica de la caña de azúcar:

- Reino : Eucariota
- Subreino : Cormobionta
- División : Magnoliophytina
- Clase : Liliatae
- Familia : Gramineae
- Tribu : Andropogonoidea
- Género : *Saccharum*
- Especies : *S. officinarum* L.

### **3.2. CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICAS DEL CULTIVO.**

**HELGFOHG S. (1 992)**, menciona que las condiciones edafoclimáticas son importantes y determinantes para un buen desarrollo del cultivo y tiene las siguientes consideraciones:

#### **3.2.1. Suelo.**

Los suelos más apropiados para el cultivo de la caña de azúcar son en general, aquellos que poseen buenas características físico-químicas tales como ser sueltos, de buen drenaje y aireación, de fácil laboreo, que retenga la humedad, con alto contenido de materia orgánica, pH entre 5,6 a 7,2.

#### **3.2.2. Temperatura.**

Las altas temperaturas influyen sobre el desarrollo de la planta y las bajas temperaturas en las zonas de cultivo facilitan el aumento en la calidad de jugos y su cosecha. Las cuales obedecen a un rango de 28 °C a 32 °C.

La primera etapa de crecimiento es influida por las altas temperaturas y una elevada humedad. Bajo estas condiciones, estos factores influyen favorablemente en el crecimiento y desarrollo de la caña de azúcar.

### **3.3. ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DE LA VARIEDAD AZUL CASA GRANDE.**

**BERNAL E. (1 992)**, menciona que la variedad azul casa grande (PCG 12 – 745) fue obtenida del cruzamiento de las líneas Co 261 x P.O.J. 2878, que se desarrolló en 1945 en la estación experimental de la Hacienda Casa Grande – Libertad.

Sin embargo cabe anotar una mutante que se caracteriza por el color verde claro de los tallos que se tornan violáceos al sol, que en 1948 se encontró en la Hacienda por el Ing. Víctor Pango Machado.

Las características agronómicas de esta variedad son las siguientes:

Brotamiento rápido, buen macollaje, resistente a la sequía, se comporta excelente para secano, es muy alta su riqueza en sacarosa. Para San Martín es una variedad muy prometedora, morfológicamente y fisiológicamente para campos industriales.

### **3.4. CULTIVO *IN VITRO*.**

**MEJÍA (1 998)**, menciona que el término de cultivo de tejidos” vegetales o de plantas se refiere al “cultivo *In Vitro*” de cualquier estructura viva de una planta, sean estas células, tejidos u órganos, bajo condiciones asépticas. La técnica *in vitro* significa literalmente “en vidrio” debido a que el cultivo se encuentra dentro de un frasco de vidrio o de plástico transparente, la

propagación "*in vitro*", también se le conoce como Micropropagación debido a la obtención y manejo de plantas en miniatura llamada "plántula".

Generalmente se emplean yemas y meristemas para regenerar nuevas plantas o estimular brotes múltiples, siendo muy importante mantener esta producción a perpetuidad.

### **3.5. CLASES DE CULTIVO *IN VITRO*.**

**MEJÍA (1 998)**, señala que existe 2 clases de crecimiento "*In Vitro*", organizado y desorganizado.

- a. Crecimiento Organizado, se denomina cuando se utilizan puntos de crecimiento meristemas apicales de tallos y raíces, ramas florales, pequeños frutos, nudos y cultivos de embriones.
  
- b. Crecimiento desorganizado; se denomina cuando segmentos de tejidos son cultivados "*In Vitro*", estos carecen de estructuras diferenciadas. El tejido organizado puede incrementarse en volumen por sucesivos sub cultivos y mantenerse en medio de cultivo por periodos muy largos.



### 3.6. MEDIO DE CULTIVO.

Según **HURTADO (1 994)**, el éxito que se obtenga de un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta de diversas especies vegetales.

Por su parte **MEJÍA (1 994)**, indica que probablemente las fórmulas estándares mejores conocidas son aquellas desarrolladas por Murashige y Skoog (1 962) en partículas MS. Este medio fue formulado inicialmente para desarrollar brotes de plantas herbáceas en las 3 fases de cultivo.

**GÓNGORA ET. AL (1 994)**, menciona que los constituyentes básicos incluyen todos los elementos y minerales esenciales para el desarrollo de la planta, macro y micronutrientes; un azúcar (usualmente sacarosa, sucrosa o glucosa), vitaminas como la tiamina, glicina, entre otros; sustancias reguladoras de crecimiento y otros compuestos.

**CUBERO (1 999)**, indica que las auxinas y citokininas cuyas proporciones relativas favorecen el desarrollo del tallo y de la raíz.

### 3.7. PROCEDIMIENTOS DE ESTERILIZACIÓN.

**MERINO (1 994)**, manifiesta que la diferencia entre un laboratorio de cultivos de tejidos vegetales y otro, son las condiciones de esterilidad de este; son de fundamental importancia porque todos los medios empleados contienen nutrientes, los cuales facilitan el crecimiento de muchas bacterias y hongos.

Por estas y muchas razones el material vegetivo se desinfecta con Hipoclorito de Sodio superficialmente antes de iniciar un cultivo *In Vitro*.

Actualmente el método más común de esterilización es el vapor húmedo, empleando autoclaves que actúan con vapor a presión. Los instrumentos como pinzas, tijeras, bisturís, etc. Se envuelve con papel aluminio para someterlos a esterilización y las espátulas, pinzas y otros generalmente se mantienen sumergidos en alcohol hasta el momento de su uso y se esterilizan conforme se van empleando, por medio de frecuentes inmersiones en alcohol , seguidas por flamea.

### 3.8. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO*.

Según **CIRGEBV (1 994)**, las ventajas de las técnicas de propagación *In Vitro* de especies vegetales, pueden ser resumidas como sigue:

### 3.8.1. Ventajas.

- Acelera el proceso de propagación.
- Representa el sistema de propagación clonal.
- Permite la eliminación de patógenos, hongos, bacterias, virus, etc.
- Posibilita el rescate de especies en peligro de extinción.
- Hace posible establecer bancos de germoplasma *In Vitro*.
- Permite el desarrollo de cultivares superiores.
- Las plantas son de crecimiento y desarrollo vigoroso resultando más resistentes a enfermedades.
- Se puede realizar la propagación de miles de plantas en un corto tiempo y espacio.

### 3.8.2. Desventajas.

- Los costos de instalación de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales son bastante elevados.
- Se debe de contar con personal calificado.
- La no disponibilidad de reactivos.
- La aclimatación de las plántulas producidas *In Vitro* ocasiona porcentajes altos de pérdidas de plántulas en esta fase.
- Se debe de contar con un vivero acondicionado para aclimatación de plantas producidas *In Vitro*.

- Se debe de contar con mano de obra especializada durante cada fase *In Vitro*.

### 3.9. HORMONAS DE LAS PLANTAS.

**GONZALES y RACIMAN (2003)**, manifiesta que el desarrollo normal de una planta depende de la interacción, factores externos (luz, nutrientes, agua temperatura) e internos (hormonas). Una definición abarcativa del término hormona es considerar bajo este nombre a cualquier producto químico de naturaleza orgánica que sirve de mensajero químico, ya que producido en una parte de la planta tiene como blanco otra parte de ella. Las hormonas y las enzimas cumplen funciones de control químico en los organismos multicelulares. Las fitohormonas pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada una de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación del crecimiento en plantas. Se incluyen al etileno, auxina, giberlina, citoquininas y el ácido abscísico, cada uno con una estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta.

Mientras que cada fitohormona ha sido implicada en un arreglo relativamente diverso de papeles fisiológicos dentro de las plantas y secciones cortadas de éstas, el mecanismo preciso del cual funcionan no es aún conocido.



### 3.9.1. Auxinas.

El nombre auxina en griego significa crecer, y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales.

Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxina libre en la planta varía de 1 a 100 mg/Kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada que en ocasiones que es sustancialmente más elevada.

La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos.

Promueve el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta.

- Estimula el crecimiento y maduración de los frutos.
- Floración
- Senectud
- Geotropismo
- Retardan la caída de las hojas, flores y frutos.

### **3.9.2. Giberelinas.**

El ácido giberelico  $GA_3$  fue la primera de esta clase de hormona en ser descubierta. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. La hormona no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como el observado para la auxina, aunque en algunas especies existe un movimiento basipétalo en el talo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis).

Además de ser encontradas en el floema, las giberelinas también han sido aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento más generalmente bidireccional de la molécula en la planta.

### **3.9.3. Citoquininas.**

Son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo, debido al uso anterior de un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citoquinina. Son producidos en las zonas de crecimiento, como los meristemos en las puntas de las raíces. La zeatina es una hormona de esta clase y se encuentra en el maíz. Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles.

Otros efectos de las citoquininas en plantas incluyen:

- Estimulación de la germinación de semillas.
- Estimulación de los frutos y semillas.
- Ruptura del letargo de semillas.
- Inducción de la formación de brotes.

- Mejora de la floración.
- Alteración en el crecimiento de los frutos.
- Ruptura de la dominancia apical.

#### **3.9.4. Ácido Abscisico.**

El inhibe el crecimiento celular y la fotosíntesis. El ácido abscisico (ABA) , conocido anteriormente como dormina, es un inhibidor del crecimiento natural presentes en plantas. Químicamente es un terpenoide que es estructuralmente muy similar a la porción terminal de los carotenoides.

El ácido abscisico es un potente inhibidor del crecimiento que ha sido propuesto para jugar un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos y estrés hídrico, y por lo tanto tiene efectos contrarios a las de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas). Típicamente la concentración en las plantas es entre 0,01 y 1 ppm, sin embargo, en plantas marchitas la concentración puede incrementarse hasta 40 veces. El ácido abscisico se encuentra en todas partes de la planta, sin embargo las concentraciones más elevadas parecen estar localizadas en semillas y frutos jóvenes y la base del ovario.

### **3.9.5. Etileno.**

El etileno siendo un hidrocarburo es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se ha sabido desde principios del siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta los años 1960 que se empezó a aceptar como una hormona vegetal, se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de estas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud, dormancia, floración y otras respuestas.

### **3.10. CULTIVO DE MERISTEMOS.**

LUCAS C. (2001) menciona que para la realización del cultivo de meristemas es aconsejable usar vástagos en crecimiento, siempre que sea posible, cuando se vaya a hacer cultivos de meristemas; cuando el meristemo que se va a aislar está activo (compuesto de una zona meristemática y una subapical que crece rápidamente), la posibilidad de eliminar virus es mayor.

Los vástagos se deben limpiar cuidadosamente, de forma previa. Se retiran las hojas de los vástagos, siempre que sea posible, y entonces los vástagos (o yemas, si no se han retirado las hojas) se sumergen durante 10 minutos en alcohol de 70 % para eliminar el aire que pueda haber atrapado. Después de estos se realiza la esterilización en lejía diluida o

$\text{Ca}(\text{OCI})_2$ , enjuagando finalmente con agua estéril. Se retiran entonces algunas hojas, trabajando con la ayuda de un estéreo microscopio (aumento de 20 - 40 x). Se continúa el proceso de esterilización, utilizando concentraciones más bajas de lejía, o con tiempos más cortos de esterilización, aclarando posteriormente con agua estéril. En algunos laboratorios, se usa alcohol de 70 % para la segunda esterilización, no haciéndose en este caso ningún enjuagado más. Si se emplea agua para el enjuagado, es posible que las gotas dificulten el aislamiento. Se retiran entonces uno por uno los primordios foliares y hojas restantes, trabajando con la ayuda del estereomicroscopio, y utilizando frecuentemente es esta operación agujas o fragmentos de cuchilla de afeitar, montados sobre el mango de aguja de siembra. El ápice del vástago se mantiene firmemente con una mano (pinza o dedos limpios), mientras que la operación se realiza con la otra mano. La aguja se debe esterilizar de forma libre, junto con uno o dos primordios foliares (generalmente un pequeño cubo de material), se corta usando una cuchilla de afeitar, y se siembra inmediatamente (para evitar que se seque), sobre un medio nutritivo. Para impedir la deshidratación del meristemo, se debería emplear luz fría, para iluminar el campo en el que se trabaja con el estereomicroscopio. El meristemo con los primordios foliares es muy pequeño (0,1 mm de diámetro; 0,2 – 0,4 mm de longitud).

Existe una mayor posibilidad de obtener plantas libres de virus, si sólo se aísla el meristemo; la posibilidad de que un meristemo sobreviva sin primordios foliares, es muy pequeña, como se ha demostrado en el caso de clavel. Por otro lado, el aislamiento de meristemas más grandes (con primordios foliares), hace que la posibilidad de obtener plantas libres de virus sea muy pequeña.

Aunque en principio todos los meristemas de vástago de una planta son adecuados como material inicial, en realidad, la posibilidad de éxito depende del tipo de yema o vástago (terminal o axilar) y / o de la posición de la yema (basal o terminal).

La composición del medio nutritivo es compleja, ya que un meristemo es una porción mínima de la planta. Cada especie vegetal diferente, e incluso distintas variedades de una misma especie pueden requerir un medio diferente. El medio de aislamiento no es generalmente el mismo que el de enraizamiento. Debido a que la elección del medio adecuado requiere un gran esfuerzo, el cultivo de meristemas debería ser utilizado exclusivamente cuando un clon está completamente infectado y cuando el tratamiento por calor no produce efecto deseado.

Los meristemas se aíslan sobre medio sólido, aunque en algunos casos se utilizan medios líquidos. El pH por lo general se sitúa entre 5,4 y 6,

siendo la sacarosa el azúcar habitual (2 - 5 %). Frecuentemente se utiliza vitaminas: Vitamina B1, piridoxina, ácido nicotínico, ácido pantoténico Los reguladores suelen utilizarse en bajas concentraciones (0,1 – 0,5 mg / l); la auxina puede ser necesaria para la formación de raíces, auxinas y citoquininas para estimular la división celular; el GA<sub>3</sub> se añade a veces para lograr la elongación del vástago.

La temperatura normal de crecimiento es de 21 - 25 °C; aunque la mayor parte de las plantas bulbosas requieren una temperatura más baja, temperaturas más altas (35 - 39 °C) se utilizan solamente, para inactivar al virus. Los meristemas se cultivan generalmente con la luz fluorescentes (longitud del día de 14 - 16 horas, irradian alrededor de 8 - 12 W m<sup>2</sup>); a veces la luz fluorescente se suplementa con algo de luz roja.

En ocasiones es necesario utilizar una irradiación más baja, durante los primeros días después del aislamiento.

### **3.11. MERISTEMO APICAL VEGETATIVO.**

**MEJIA A. (1 994)**, Indica que el primer reconocimiento que en un sistema de tallo se origina a partir de un pequeño grupo de células fue hecho por Kaspar Wolf en 1759, estos pequeños grupos de células son conocidos como "shoot apical meristem", debido a que el meristemo apical del tallo



es el origen del tallo, esto puede ser descrito como el que hace el tallo. El meristemo apical hace al tallo a través de sus cuatro funciones.

- El origen de nuevos órganos.
- El origen de nuevos tejidos.
- Señales de comunicación con el resto de la planta.
- Asimismo, el mantenimiento como una región formativa.

Como estas funciones están integradas dentro del meristemo apical para producir el tallo, ha sido la pregunta de muchos investigadores y continúa siendo una intriga.

Muchos estudios recientes han enfocado sobre los procesos del meristemo floral. Aún más, antes que se forme el meristemo floral (e inflorescencia), el meristemo apical vegetativo es la fuente de células del tallo. Este estado primario del meristemo apical incluye un grupo de tejidos y órganos con características distintas. Posteriormente, los procesos en los meristemos vegetativos pueden influir en los procesos futuros de meristemos.

### 3.12. MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CAÑA DE AZÚCAR.

RIZZO (2 001), menciona que las inversiones para desarrollar cultivos de caña de azúcar de alta producción, nos obligan a establecer la obtención de semilla por medios biotecnológicos, lo cual es una solución para su registro, certificación y pureza adecuada y destaca lo siguiente:

A principios de 1980, la biotecnología comienza a hacer su aparición con el desarrollo de cultivo de tejidos en la agricultura para su mejor propagación. La caña de azúcar, por su complejidad genética no se ha desarrollado tan rápidamente en esta disciplina con respecto a otros cultivos, sin embargo, con el requerimiento técnico adecuado se está implantando en la actualidad, la producción de vitroplantas en diversos países. Y de acuerdo al departamento de ciencia y Técnica del Ministerio del Azúcar de Cuba, el proceso de la obtención de las vitroplantas consta de 5 fases:

1. Selección del material.
2. Establecimiento y saneamiento "*In Vitro*".
3. Multiplicación.
4. Enraizamiento.
5. Adaptación.

En el desarrollo de estas fases, se establece: a) la velocidad de multiplicación b) la conservación de la pureza genética de la variedad c) el saneamiento de 5 enfermedades:

1. Raquitismo de los retoños
2. Virus del mosaico
3. Escaldadura foliar
4. Gomosis
5. Virus baciliforme.

El carbón y la roya, se la diagnostica visualmente.

El hecho de que salgan las plántulas libres de las enfermedades mencionadas, no quiere decir que son inmunes a las mismas, dependiendo esto del medio ambiental y la resistencia genética de cada una de las variedades.

**ROCA (1 991)**, Destaca que el coeficiente de multiplicación de caña de azúcar es bajo y por ello la micropropagación *In Vitro* de este cultivo es útil. Esta técnica se aplica en los bancos de germoplasma, en el intercambio de material genético, en la producción de plántulas para selección, en la producción comercial de semillas y en el saneamiento de clones para eliminar *Ustilago sp.*, el mosaico y la enfermedad del retoño achaparrado.

En la micropropagación se emplean meristemos apicales y axilares, aunque se prefieren los primeros porque están libres de contaminación y presentan menos problemas con la fenolización. En 1985 Screenivasa y Screenivasa, colocaron explantes de meristemos apicales de 0,5 cm de longitud, esterilizados con alcohol al 70 % y con hipoclorito de calcio al 10 %, en medio de White líquido; este se suplemento con 2 mg/l de glicina, 0,5 mg/l de ácido giberelico, 1,0 mg/l de ácido. indolbutirico, 1,07 mg/l de cinetina, 100 mg/l de mioinositol, 10 % de agua de coco y 20 g/l de sacarosa.

A las 3 ó 4 semanas los meristemos pasaron a otro medio para la inducción del ahijamiento: esta requiere mayores niveles de citoquininas en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos indican que se pueden obtener 10 000 individuos en un año a partir de un solo meristemo.

**TOLEDO E. (2 003)**, menciona que La biotecnología aplicada a la caña de azúcar se puede dividir en tres tópicos: producción, mejoramiento y conservación.

En el caso de producción, las técnicas se han dirigido a la multiplicación de las plantas y a la limpieza de virus, especialmente para programas de

semilla, que se benefician sus procesos al iniciar con plantas de alto nivel sanitario.

Por otro lado las velocidades de multiplicación para obtener una gran cantidad de plantas con corto tiempo son importantes, es así que, si deseamos propagar miles de plantas se puede utilizar la técnica de inmersión temporal, el cual se puede obtener hasta 10,000 plantas en un mes utilizando un solo bioreactor.

En el caso de mejoramiento genético, es importante la utilización de la variación somaclonal para la obtención de plantas con características de resistencia a patógenos como: hongos, bacterias, suelos salinos, roya, herbicidas, etc. Estas técnicas son ideales en caña de azúcar debido a la dificultad en el desarrollo del mejoramiento convencional en nuestro país.

En conservación, las técnicas de conservación *In Vitro* han provisto una gran alternativa en el mantenimiento de grandes cantidades de accesiones en períodos largos de incubación, debido principalmente al uso de estresantes osmóticas que reducen la velocidad de crecimiento, en el caso de la caña de azúcar se puede mantener por hasta 10 meses en condiciones *In Vitro*.

Con la ayuda de las técnicas moleculares y citogenéticas se ha podido confirmar la información correspondiente a los orígenes de la especie del género *Saccharum*. En el caso de las variedades comerciales, la mayoría se han originado del cruce entre *S. Officinarum* con *S. Spontaneum*, pero la subsiguiente nobilización (cruce con una caña noble), por lo que esta reduciendo un estrechamiento de la variabilidad que no favorece a la búsqueda de nuevas variedades.

### **3.12.1. Variabilidad e inducción de mutaciones *In Vitro* en Caña de Azúcar.**

**ROCA (1 991)**, En la caña de azúcar se han realizado trabajos de mejoramiento genético mediante cultivo *In Vitro* y se considera que esta especie es ideal para este cultivo.

Los estudios en los cuales se evalúa la variabilidad producida por los cultivos *In Vitro* son aún más contradictorios. **FELDEMANN (1 984)**, analizó de 10 a 16 sistemas enzimáticos en plantas obtenidas de callos de 13 variedades y concluyó que la caña de azúcar es una planta estable en los cultivos *In Vitro* y que los cambios producidos se deben al rejuvenecimiento y a la sanidad de las plantas regeneradas. Iguales conclusiones extraen **Kresovich et al (1986)** del estudio de 5 000 plantas obtenidas de dos clones, es decir los cambios producidos por el cultivo de

tejidos no son frecuentes y se pueden confundir con alteraciones temporales o con las quimeras formadas en el proceso de diferenciación.

Empleando la variabilidad producida por el cultivo *In Vitro*, se han obtenido subclones interesantes de caña de azúcar. No obstante los conocimientos adquiridos sobre los factores que influyen en la variabilidad, o sea, el medio de cultivo adecuado, la elección de los órganos que produzcan variabilidad, el manejo de los cultivos *In Vitro* y por último la calidad de genotipo para producir la variabilidad, indican que se emplean muta génesis conjuntamente con el cultivo *In Vitro*.

### **3.12.2. Ensayo comparativo de cultivo *In Vitro* de caña de azúcar.**

**SANTANA (2 001)**, resume en su investigación que Los métodos de micro propagación *In Vitro* y propagación agámica por estacas fueron estudiados comparativamente para las variedades de caña de azúcar C187-80, B7274, MY 5777 y MY 5489. Mediante el primer método, partiendo de un meristemo apical se obtuvieron 500 plantitas por variedad. Después de una selección negativa, las plantitas restantes fueron transferidas a bolsas de polietileno conteniendo una mezcla de suelo y posteriormente fueron

colocadas en condiciones de vivero. Dos meses más tarde y después de otra selección negativa, se transplantaron al campo y simultáneamente se sembraron estacas de las mismas variedades, en idénticas condiciones. Cien cepas de las plantas endurecidas y cien de las agámicas fueron estudiadas, observándose características morfológicas (altura, grosor y número de tallos) y de rendimiento grados Brix. Los datos fueron evaluados mediante el análisis de componentes principales y factoriales de correspondencia simple. Los resultados muestran un incremento significativo de la altura y el número de tallos para el método de micro propagación y de diámetro de tallo para la propagación agámica. Los grados Brix no presentaron variaciones entre los métodos estudiados.

Llegando a la siguiente conclusión:

1. El método de micro propagación *In Vitro* presenta mejores resultados que el de estacas, para la producción de semillas de caña de azúcar, sobre todo en la formación de tallos.
2. Las variedades responden diferencialmente ante la micro propagación. Igualmente el contenido de grados Brix es diferencial para cada variedad, independientemente del método de propagación.



3. Las selecciones negativas realizadas durante la implantación y desarrollo de las plantas micro propagadas, propiciaron que no existiera variabilidad en el material examinado, comportándose como una población homogénea para cada variedad.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. MATERIALES.

**Cuadro N° 01. Materiales empleados para la realización del experimento.**

MATERIALES DE CAMPO Y LABORATORIO	MATERIALES FOTOGRAFICOS Y DE OFICINA	EQUIPOS
Formato de evaluaciones	Películas Kodak Color	Cámara de flujo laminar
Gel rite	Cámara fotográfica	Olla autoclave
Hojas y mangos de bisturí	Pilas	Estufa
Pinzas	Papel Bond A4	Destilador
Algodón	Lapiceros	Refrigerador
Clw wrap	Lápices	Agitador magnético
Papel aluminio	Borrador	pH-metro
Tijeras	Computadora	Esteremicroscópio
Alcohol	Disketes	Estantes metálicos
Lejía al 5,25 %	Tinta para impresora	
Tubos de ensayo	Plumón marcador	
Pipetas graduadas		
Sucrosa		
Medios de cultivo		
Carbón activado		
Placas petrí		
Agua destilada		

## 4.2. METODOLOGÍA.

### 4.2.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.

El presente experimento se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales de la Universidad Nacional de San Martín Morales, situado en la ciudad universitaria de la Facultad de Ciencias Agrarias.

#### 4.2.1.1. Ubicación política.

- Distrito : Morales
- Provincia : San Martín
- Departamento : San Martín

#### 4.2.1.2. Ubicación geográfica.

- Longitud Oeste : 76° 22' 48,4"
- Latitud sur : 06° 29' 13,2"
- Altitud : 278 m.s.n.m.
- Clima : Bosque Seco Tropical (**bs -T**)  
Según **HOLDRIDGE (1972)**

#### 4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se utilizó un Diseño Experimental Completamente al azar con 5 tratamientos y 10 repeticiones, empleados para el cultivo de la caña de azúcar, variedad 'Azul Casa Grande'.

##### 4.2.2.1. Análisis de varianza.

**Cuadro N° 02.** Análisis de varianza del experimento.

F de Variación	Grados de libertad	
	Tratamientos	$t - 1$
Error	$t(r - 1)$	45
Total	$r * t - 1$	49

#### 4.2.3. CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO.

##### 4.2.3.1. Obtención del material vegetal.

El material vegetal se recolectó del establecimiento experimental del fundo 'Miraflores' de propiedad de la UNSM. Donde se encontraba esta variedad (azul casa grande) teniendo en cuenta la calidad fitosanitaria y cualidades agronómicas deseables (buen diámetro de tallo, entre nudos bien desarrollados y libre de cualquier ataque de plagas y enfermedades) de las accesiones recolectadas de la variedad pertinente.

Los tallos fueron divididos en los segmentos nodales y sumergidos en una solución desinfectante. Estos segmentos fueron sembrados para la obtención de brotes tiernos.

#### 4.2.3.2. Medios de cultivo.

**Cuadro N° 03.** Componentes y dosis de cada uno de los medios en estudio

Componentes	Medio 0	Medio I	Medio II	Medio III	Medio IV
<b>Macroelementos</b>	MS	MS	MS	MS	MS
<b>Microelementos</b>	MS	MS	MS	MS	MS
<b>Sucrosa (g/l)</b>	20	20	20	20	20
<b>Mioinositol (mg/l)</b>	----	100	100	100	100
<b>Ac. Nicotínico (mg/l)</b>	----	0,5	----	0,5	----
<b>Tiamina HCl (mg/l)</b>	----	1,0	1,0	1,0	0,1
<b>Piridoxina (mg/l)</b>	----	0,5	----	0,5	----
<b>AIA(mg/l)</b>	----	1,3	----	5,0	3,0
<b>2,4 - D(mg/l)</b>	----	----	3,0	----	----
<b>6 – BAP(mg/l)</b>	----	1,0	----	2,0	----
<b>Agua de coco (%)</b>	----	10	18	10	----
<b>Gel rite (g/l)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>Carbón activado (g/l)</b>	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
<b>pH</b>	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

**T<sub>0</sub>: Medio Basal (Murashige y Skoog) 1962**

**T<sub>1</sub>: Heinz y Mee 1969, Modificado**

**T<sub>2</sub>: Payan y Tarcon, 1997**

**T<sub>3</sub>: H.S.P.A (Hawaian Sugar Planters Association) 1977**

**T<sub>4</sub>: Salazar E y Sarga J. 1986, modificado**

#### **4.2.3.3. Preparación de los medios de cultivo.**

Los medios de cultivo empleados para la propagación *In Vitro* de caña, comprenden de un complejo de sales minerales de MS-1962, hormonas, vitaminas y otros insumos, el cual fueron preparados el 11/ 12 / 03.

Para la preparación de los diferentes medios de cultivo se preparó la solución basal de MS para cada medio de cultivo tomados como tratamientos en estudio, procediendo a agregar los diferentes componentes nutritivos e insumos según su formulación de acuerdo a cada tratamiento formulado, el cual se detalla en el cuadro N° 03 empleando los materiales y equipos necesarios para este proceso, así mismo la preparación se observa en las fotos 01 y 02 del anexo.

#### **4.2.3.4. Preparación y desinfección del explante.**

Seleccionado los brotes adecuados, foto N° 03 del anexo, se procedió a limpiarlos con una solución de detergente comercial (5 g/l), mostrado en la foto N° 04 del anexo, utilizando una escobilla de cerdas suaves para retirar el material muerto y el polvo de la superficie. Se enjuagó con agua corriente continua hasta eliminar los residuos de detergente. Luego, se trasladó a la cámara de siembra y bajo flujo de aire estéril se procedió a sumergir en

alcohol etílico al 96% durante 15 segundos y después se expuso en una solución de Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% durante 8 minutos como se observa en la foto N° 05. Estas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril, cada enjuague duró como mínimo dos minutos para garantizar la total eliminación del hipoclorito.

Todos estos pasos se realizó bajo agitación constante. Finalizado el procedimiento de desinfección se colocaron los brotes en un Beaker con agua destilada estéril.

#### **4.2.3.5. Obtención del explante para la siembra *In Vitro*.**

El explante inicial, se colocó en una placa petrí estéril y con el empleo de un estéreomicroscópio, pinza y bisturí se procedió a la eliminación de las hojas hasta la obtención del domo meristemático conteniendo 3 ó 4 primordios foliares a la cual se le práctico un corte perpendicular para separarlo del resto de tejido, como se observa en las fotos N° 06 y N° 07 del anexo.

#### **4.2.3.6. Establecimiento del explante.**

Los explantes obtenidos (domo meristemático con 2 ó 3 primordios) fueron sembrados en tubos de ensayo conteniendo 20 ml. de medio de cultivo sólido (un meristemo por tubo) los cuales



fueron rotulados debidamente. Estos fueron cubiertos con bolsas plásticas de color negro y llevadas a la sala de incubación a una temperatura  $24^{\circ}\text{C} \pm 2$  y una Humedad relativa de 80 % manteniéndose así durante 15 días, después de las cuales fueron descubiertas para ser establecidos a iluminación de 3 000 lux,  $25^{\circ}\text{C}$  y Fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, controlado por un timer de 40 amperios.

#### **4.2.4. Parámetros evaluados.**

Los parámetros evaluados durante toda la fase de establecimiento e inducción *In Vitro* de plántulas de caña de azúcar de la variedad 'Azul Casa Grande' fueron las siguientes:

##### **a. Porcentaje de contaminación.**

El porcentaje de contaminación de los explantes se evaluó semanalmente hasta los 15 días después de la siembra *In Vitro* en todos los tratamientos establecidos.

##### **b. Fenolización.**

El porcentaje de fenolización de los explantes se evaluó semanalmente hasta los 56 días después de la siembra *In Vitro* en todos los tratamientos establecidos.



**c. Velocidad de crecimiento.**

La velocidad de crecimiento de las plántulas establecidas en cada tratamiento se registró con la toma de datos de altura promedio (que consistió desde la base de la planta hasta el punto de crecimiento) de las plántulas en cada observación hasta los 56 días.

**d. Número de brotes.**

El número de brotes emitido por meristemo inducido, en los respectivos tratamientos, se registró con el número promedio de brotes de cada observación en los respectivos tratamientos hasta los 56 días después de la siembra *In Vitro*.

**e. Número de hojas.**

El número de hojas se evaluó en el meristemo inducido, así como en sus respectivos brotes, ejecutando un promedio en cada observación por tratamiento hasta los 56 días.

**f. Número de raíces.**

El número de raíces se evaluó en todo el macollo emitido por el meristemo inicial, ejecutando un promedio por observación en su respectivo tratamiento hasta los 56 días.

**g. Longitud de raíces.**

La longitud de raíces se evaluó en todo el macollo emitido por el meristemo inicial, a los 56 días después de la siembra *In Vitro*, para el cual se retiraron las plántulas del recipiente que lo contenía. Ejecutando un promedio por observación en su respectivo tratamiento.

## V. RESULTADOS.

### 5.1. CONTAMINACIÓN.

Cuadro N° 04: Contaminación por medio de cultivo expresado en proporción.

Azul casa grande	A los 14 días después de la siembra				
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
Meristemos	1/10	1/10	2/10	2/10	1/10

### 5.2. FENOLIZACIÓN.

Cuadro N° 05: Número total de explantes fenolizados en 4 evaluaciones durante 28 días después de la siembra *In Vitro*.

Tratamientos	Grados de fenolización a los 28 días después de la siembra				
	F0	F1	F2	F3	F4
T <sub>0</sub>	-----	2	2	1	2
T <sub>1</sub>	-----	-----	-----	1	2
T <sub>2</sub>	-----	1	-----		2
T <sub>3</sub>	-----	2	-----	1	2
T <sub>4</sub>	-----	3	-----	1	1

Cuadro N° 06: grados de fenolización.

Grado	% fenolización	Interpretación
F0	0	No fenolizado
F1	Hasta 10	Leve
F2	Hasta 35	Medio
F3	Hasta 80	Alto
F4	Hasta 100	Muerte

Fuente: León (1 995).

### 5.3. SUPERVIVENCIA.

**Cuadro N° 07:** Proporción de supervivencia de los meristemas a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.

Azul casa grande	A los 56 días después de la siembra				
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
<b>Meristemas</b>	6/10	6/10	6/10	5/10	7/10

### 5.4. NÚMERO DE BROTES.

**Cuadro N° 08:** Influencia de los tratamientos sobre el número de brotes por meristemo inducido a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.

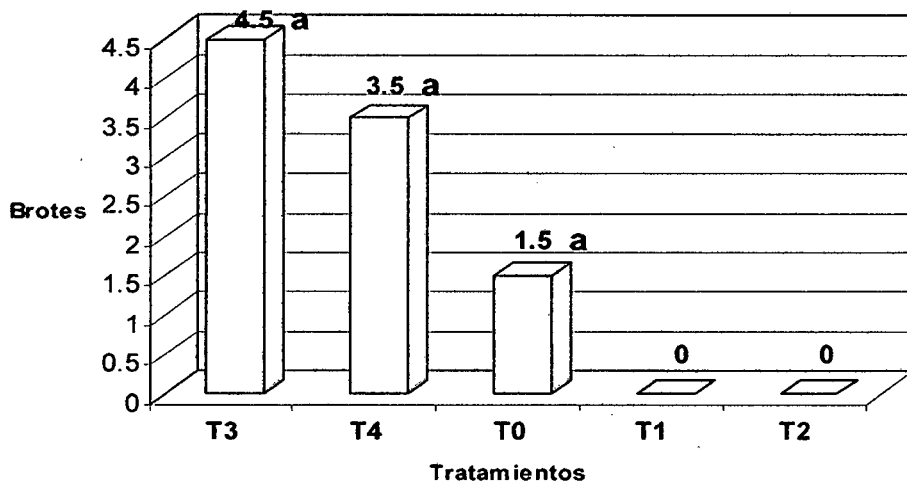
F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
<b>Tratamientos</b>	2	9.33	4.67	9.33	N. S
<b>Error</b>	3	1.5	0.5		
<b>Total</b>	5	10.83	5.17		

**CV. = 22.37 %**

**R<sup>2</sup> = 86.15 %**

**X = 3.16**

**Grafico N° 01:** Prueba de Duncan para la influencia de los tratamientos en el número de brotes por meristemo inducido a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.



### 5.5. NÚMERO DE HOJAS.

**Cuadro N° 09:** Influencia de los tratamientos sobre el número de hojas en los brotes obtenidos a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.

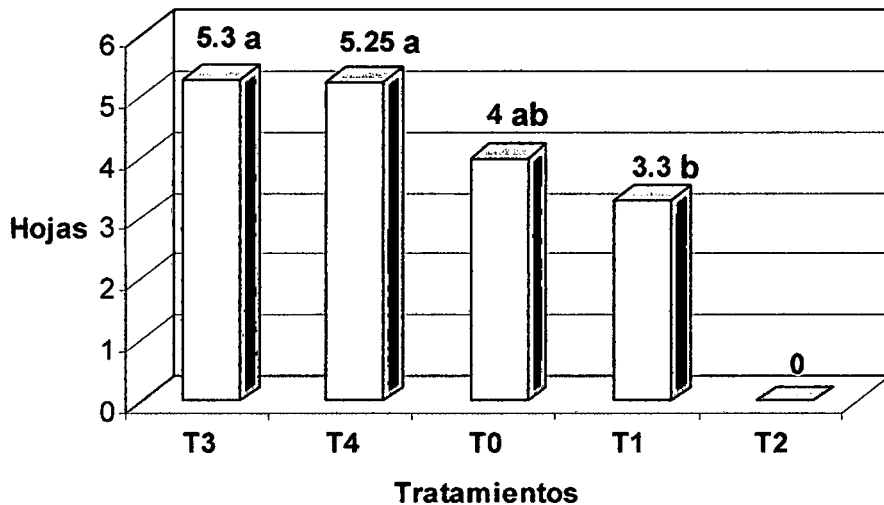
F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	3	2.83	2.94	11.31	**
Error	8	3.08	0.26		
Total	11	10.92	3.20		

CV. = 11.43 %

$R^2 = 80.86 \%$

$X = 4.46$

**Grafico N° 02:** Prueba de Duncan para la influencia de los tratamientos en el número de hojas por meristemo inducido a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.



### 5.6. NUMERO DE RAÍCES.

**Cuadro N° 10:** Influencia de los tratamientos sobre el número de raíces en el macollo a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.

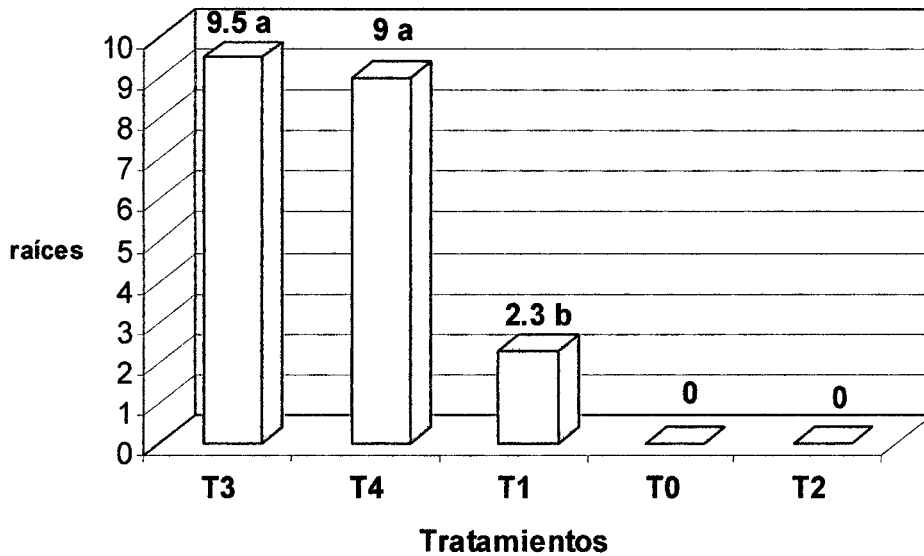
F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	2	56.39	28.19	53.42	**
Error	6	3.17	0.53		
Total	8	59.56	28.72		

CV. =10.5 %

$R^2 = 94.7 \%$

$X = 6.94$

**Grafico N° 03:** Prueba de Duncan para la influencia de los tratamientos en el número de raíces por meristemo inducido a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.



### 5.7. LONGITUD DE RAÍCES.

**Cuadro N° 11:** Influencia de los tratamientos sobre la longitud de raíces a los 56 días después de la siembra *In Vitro*.

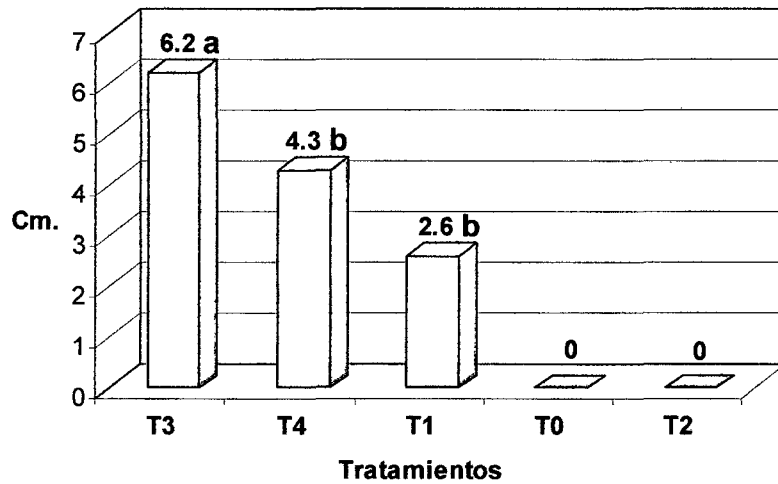
F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	2	16.31	8.17	42.65	**
Error	6	1.15	0.19		
Total	8	17.46	8.35		

CV. = 9.98 %

$R^2 = 93.42 \%$

$X = 4.38$

**Grafico N° 04:** Prueba de Duncan para la influencia de los tratamientos en la longitud de raíces por meristemo inducido a los 56 días después de la siembra In Vitro.



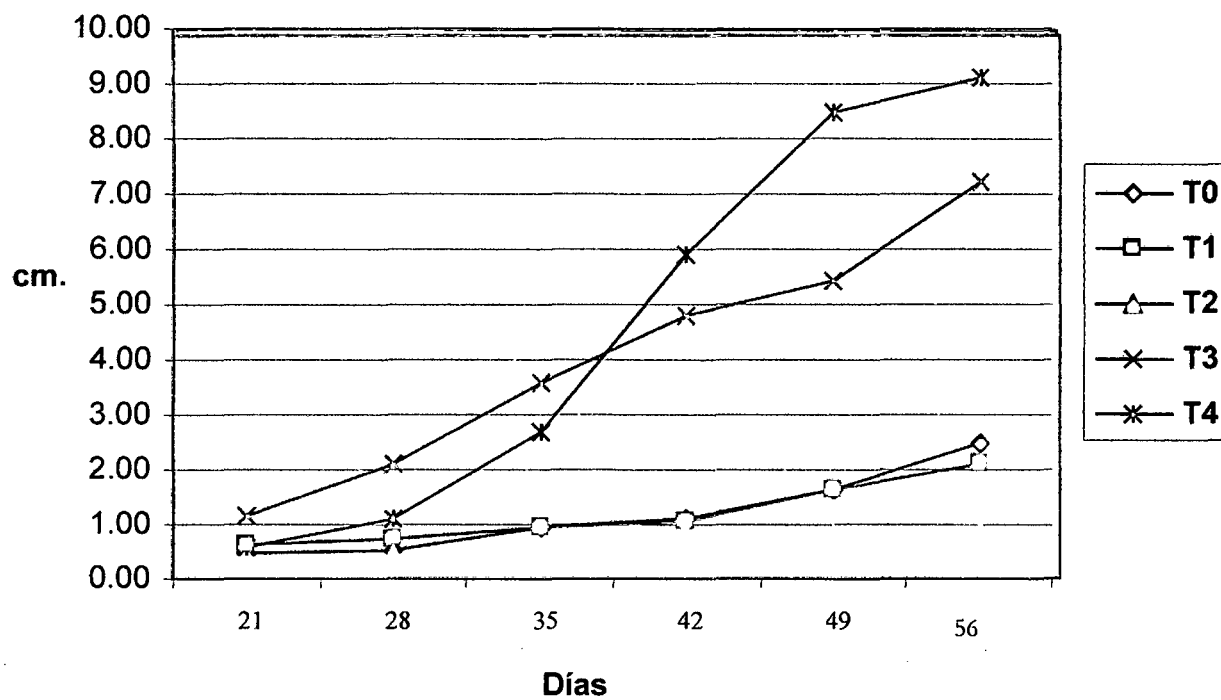
### 5.8. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.

**Cuadro N° 12:** Influencia de los tratamientos en la velocidad de crecimiento de las plántulas a los 56 días después de la siembra.

Tratamientos	Velocidad de crecimiento por días (cm)					
	21	28	35	42	49	56
T0	0.47	0.53	0.97	1.12	1.63	2.50
T1	0.62	0.73	0.97	1.04	1.65	2.10
T2	0.40	0.46	0.52	0.70	0.85	0.92
T3	1.16	2.12	3.60	4.80	5.40	7.20
T4	0.60	1.10	2.70	5.90	8.50	9.10



**Grafico N° 05:** Curva de la velocidad crecimiento de las plántulas en los medios de cultivo puestos en estudio



## **VI. DISCUSIONES.**

### **6.1. CONTAMINACIÓN POR MEDIO DE CULTIVO.**

Durante la introducción *In Vitro* de los meristemos, se obtuvo un porcentaje mediano de contaminación el cual se observa en el cuadro N° 04 y la contaminación existente mayormente se puede haber originado debido a la falta de asepsia durante los procesos de extracción y siembra de meristemos.

**HARTMAN Y KESTER (1991)**, manifiestan que para la propagación de tallos y meristemos el procedimiento de desinfección debe iniciarse sumergiendo a los explantes en alcohol (70 al 95%) para darles una esterilización superficial preliminar

### **6.2. FENOLIZACIÓN.**

Durante el proceso de desarrollo *In Vitro* de los explantes introducidos se presentaron diferentes grados de fenolización en los explantes introducidos el cual se observa en el cuadro N° 05 donde se expresa los meristemos fenolizados. El grado de fenolización F3 y F4 que corresponde a un porcentaje de fenolización crítico para el desarrollo del meristemo en crecimiento y posteriormente provoca la muerte de este,

Los resultados de fenolización obtenidos de acuerdo a las evaluaciones dadas en el cuadro N° 5 muestran que el T0, T1 y T3, presentaron un mayor número de explantes fenolizados en la escala de F3 y F4. Estos resultados no se obvian por ser un parámetro específico para la supervivencia de los explantes, debido a que el tejido vegetal de la caña de azúcar esta saturado de polisacáridos altamente oxidantes y el meristemo al ser sometido al corte libera fenoles al ponerse en contacto con el medio de cultivo. **ROCA (2 002)** menciona que los meristemos apicales presentan menos problemas con la fenolización que los meristemos axilares empleados para la propagación *In Vitro*.

**HARTMAN y KESTER (1991)**, menciona que las plantas de algunas especies contienen sustancias endógenas que exudan de las superficies cortadas al medio del cultivo, esos exudados se pueden lixiviar o lavar con cambios frecuentes de agua. Esta inhibición se puede contrarrestar empleando antioxidantes.

### **6.3. SUPERVIVENCIA.**

El número de explantes eliminados por contaminación y fenolización no afectaron el normal establecimiento de evaluación de los parámetros puestos en estudio, ya que los meristemos sembrados en los diferentes tratamientos presentaron un normal desarrollo hasta el final del período evaluado,

#### 6.4. NÚMERO DE BROTES.

En el cuadro N° 08 y grafico N° 01 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto al número de brotes presentes en cada explante introducido.

La prueba de f, arrojó una no significancia estadística para los promedios obtenidos en los tratamientos en estudio; esta no significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, grafico N°01.

Los valores obtenidos para el C.V. con **22,37 %** y  $R^2$  con **86,15 %** Corroboran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

El análisis de Duncan para el respectivo parámetro evaluado (grafico N° 01) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde se corrobora la no significancia de los tratamientos obtenidos en la prueba de f, no se pudo demostrar la diferencia numérica promediada obtenida por cada tratamiento. En la cual el  $T_3$  con un promedio de brotes de **4,5** superó numéricamente al resto de tratamientos, y no presenta diferencias significativas estadísticamente con estos, seguido por el  $T_4$  y  $T_0$ , con **3,5** y **1,5** respectivamente.

Estos resultados tienen clara relación con el contenido químico de cada medio de cultivo puesto en estudio referente al crecimiento del meristemo de azul casa grande, obteniéndose el mejor número de brotes en el T<sub>3</sub> que posee una variante hormonal (auxina – citokinina) superior al resto de tratamientos el cual a influido en este resultado. Así mismo la no presencia de brotes en el T<sub>1</sub>, posiblemente se deba al menor contenido hormonal propuesto en **HEINZ y MEE modificado (1 969)**, en otras variedades de caña de azúcar, Así mismo también se explica la ausencia de brotes en el T<sub>2</sub> que solamente presento la formación de callo, debido al contenido de 2,4-D en el medio de cultivo según **MEJÍA (1 994)**, son muy efectivos en la inducción y desarrollo de callos.

#### **6.5. NÚMERO DE HOJAS.**

En el cuadro N° 09 y grafico N° 02 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto al número de hojas presentes en el meristemo inducido, así como en sus respectivos brotes.

La prueba de f, arrojo una alta significancia estadística para los promedios obtenidos en los tratamientos en estudio; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, grafico N° 02.

Los valores obtenidos para el C.V. con 11,43 % y  $R^2$  con 80,86 % Corroboran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

El análisis de Duncan para el respectivo parámetro evaluado nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde se corrobora la significancia obtenida de los tratamientos en el que el  $T_3$ , con un promedio de 5,3 obtuvo el mayor promedio de hojas y manteniendo una relación no significativa estadísticamente con el  $T_4$  con un promedio de 5,25 no obstante superando al resto de tratamientos. Así mismo el  $T_3$  mantiene relación no significativa con el  $T_0$  que obtuvo un promedio de 4. Así vez también el  $T_0$  se relaciona con el  $T_1$  por una diferencia no significativa que obtuvo el promedio de 3,3 que representa el promedio más bajo. Estos resultados tienen relación con la composición de los medios propuestos.

**SELENA (1999)**, manifiesta que las sales minerales y otras fuentes como vitaminas, hormonas empleadas en el medio de cultivo M&S, actúa directamente en desarrollo de los protocormos y formación de hojas e induce la salida de raíces.

## 6.6. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL NÚMERO DE RAÍCES.

En el cuadro N° 10 y grafico N° 03 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto al número de raíces.

La prueba de  $f$ , arrojó una alta significancia estadística para los promedios obtenidos en los tratamientos en estudio; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, grafico N° 03

Los valores obtenidos para el C.V. con 10,5 % y  $R^2$  con 94,7 % Corroboran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

El análisis de Duncan para el respectivo parámetro evaluado (grafico N° 03) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde el  $T_3$  con 9,5 y  $T_4$  con 9 obtuvieron el promedio más elevado superando al resto de tratamientos. Seguido por el  $T_1$  con promedio de 2,3 respectivamente que a su vez mantiene una relación estadística no significativa. No obstante el  $T_0$  y  $T_2$  no presentaron raíces debido básicamente a que el  $T_0$  solamente presentó composición mineral MS y el  $T_2$  dio formación de callo por la acción influyente del 2,4-D.

**ARDITTI (1977)**, menciona que las plántulas responden a los cambios de medio y la composición que contengan, como el caso de auxinas que actúa

directamente en la formación de raíces, así como las condiciones ambientales controladas (Temperatura, luz, humedad relativa, fotoperíodo 16/8).

### **6.7. Influencia de los tratamientos sobre la longitud de raíces.**

En el cuadro N° 11 y grafico N° 04 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto a la longitud de raíces.

La prueba de  $f$ , arrojó una alta significancia estadística para los promedios obtenidos en los tratamientos en estudio; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, grafico N° 04.

Los valores obtenidos para el C.V. con 9.98 % y  $R^2$  con 93.42 % Corroboran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

El análisis de Duncan para el respectivo parámetro evaluado (cuadro N° 11) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde el  $T_3$  con 6,2 cm obtuvo el promedio más elevado superando estadísticamente al resto de tratamientos. Seguido por el  $T_4$  y el  $T_1$  con promedios de 4,3 y 2,6 cm respectivamente que a su vez mantiene una relación estadística no significativa. Este parámetro no se evaluó en el  $T_0$  y  $T_2$  debido a la ausencia de raíces explicado anteriormente.



**ARDITTI (1977)**, menciona que las plantas para que se desarrollen deben obtener los nutrientes necesarios del medio, el cual esta función lo realizan las raíces, gracias a que buscan los medios necesarios, el cual se produce los procesos fisiológicos y enzimáticos en la planta para su desarrollo.

#### **6.8. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.**

En el  $T_4$  se presento el mejor resultado de crecimiento del meristemo inducido de azul casa grande, con un promedio de 9,1 cm. de longitud, seguidos por el  $T_3$ , con un promedio de 7,20 cm. de longitud, estos medios de cultivo presentaron los mejores resultados en cuanto a la velocidad de crecimiento, referente al resto de tratamientos donde los meristemas presentaron leve desarrollo en la velocidad de crecimiento, en la cual el  $T_0$  y  $T_1$  obtuvieron promedios de 2,5 cm y 2,1 cm. respectivamente y el  $T_2$  con 0.92 cm.

## VII. CONCLUSIONES

- 7.1.** En los ápices caulinares de la caña de Azúcar existe una alta incidencia de microorganismos, principalmente bacterias de tipo endógeno, de difícil control y las cuales están presentes hasta en los explantes de 0,5 mm de longitud.
  
- 7.2.** La fenolización de los meristemas de la variedad azul casa grande en los medios de cultivo empleados fue un factor decisivo en la pérdida de meristemas diferenciados.
  
- 7.3.** La mayor eficiencia de diferenciación respecto a los tratamientos evaluados se dio en el T<sub>3</sub> por una mayor inducción y desarrollo del meristemo, obteniéndose plántulas completas y vigorosas listas para su aclimatación.



## VIII. RECOMENDACIONES.

- 8.1. Emplear un compuesto antioxidante en los medios de cultivo propuestos en la propagación *In Vitro* de caña de azúcar para evitar pérdida de unidades experimentales en caña de azúcar.
- 8.2. Dejar el meristemo con dos a tres primordios foliares para que no se fenolizen al momento del sembrado en los respectivos medios.
- 8.3. Durante la extracción de meristemos para la siembra, emplear un bisturí para cada meristemo, de esta manera evitar la propagación de algún patógeno existente en un meristemo al los demás meristemos que se requiere sembrar.
- 8.4. Continuar con otros trabajos referentes a la prueba de medios de cultivos en otras variedades.

## IX. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de Tejidos vegetales de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, con título “Evaluación de Medios de Cultivo en la Propagación *In Vitro* de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*) a Partir de Meristemos”, así mismo tuvo como objetivos: Desarrollar un protocolo eficiente para la diferenciación de meristemos y evaluar la eficiencia de los medios puestos en estudio.

El diseño empleado fue Diseño Experimental Completamente al azar con 4 tratamientos mas un testigo y 10 observaciones. Los tratamientos fueron T0 (M&S), T1 (Heinz y Mee), T2( Payan y Tarcon), T3 (H.S.P.A) Y T4(Salazar y Surga).

Los resultados demostraron que los meristemos a la semana de ser sembrados en los medios ya se habían diferenciado, puesto que el tratamiento que mas respondió fue el T3 por que se pudo obtener plántulas completas y vigorosas ya que le medio tuvo un equilibrio balanceado de hormonas lo que permitió que los meristemos se desarrollen normalmente.

Pero cabe mencionar que la contaminación y fenolización fueron un parámetro en la cual se tuvo problemas, ya que al domo meristemático al hacer el corte perpendicular se oxida ya que tiene polifenoles y la contaminación es otro factor a tener en cuenta al momento de hacer la siembra en los respectivos medios.

## SUMMARY

The present investigation work one carries out in the laboratory of cultivation of Fabrics vegetables of the National University of San Martin - Tarapoto, with I title ""Evaluation of Means of Cultivation in the Propagation In Vitro of Cane of Sugar (Saccharum officinarum) starting from Meristemos", likewise he/she had as objectives: To develop an efficient protocol for the meristemos differentiation and to evaluate the efficiency of the on means in study.

The used design was Experimental Design Totally at random with 4 treatments but a witness and 10 observations. The treatments were T0 (M&S), T1 (Heinz and Urinate), T2 (Payan and Tarcon), T3 (H.S.P.A) AND T4 (Salazar and Surga).

The results demonstrated that the meristemos a week of being sowed in the means had already differed, since the treatment that but he/she responded the T3 for that one could obtain complete and vigorous plántulas since him means was he/she had a balanced balance of hormones what allowed that the meristemos is usually developed.

But it is necessary to mention that the contamination and fenolización were a parameter in which one had problems, since to the dome meristemático when making the perpendicular cut is oxidized since he/she has polifenoles and the contamination is another factor to keep in mind to the moment to make the siembra in the respective means.

## X. BIBLIOGRAFIA.

1. **ARDITTI J. (1 977)**. Lewis Knudson: His Science, his times and his legacy. Lindleyana. 5 Pp 1- 79.
2. **BERNAL ESQUIVEZ Alejandro. (2 001)**. Empresa agroindustrial Casa grande.
3. **BOTTA (1 990)**. Taxonomía Vegetal. V Edición. Editorial LIMUSA. México D.F. – México. 512 pp.
4. **CIRGEBV (1 994)**, “Resúmenes del primer curso de propagación *In Vitro* de plantas ornamentales”. Centro de investigación en Recursos genéticos y biotecnología. Lima – Perú.
5. **CUBERO, J (1 999)**, “Introducción a la mejora genética vegetal”, Edit. Mundi – Prensa, España, pp. 223 – 225.
6. **FELDEMAN (1 989)**, The Evolution of Asexual Reproduction in Plants, Londres, pp. 80 – 85.

7. **GÓNGORA, G CANSINO, G y HOTSON, E (1994)**, “Programa de biotecnología en especies frutales promisorias”. Libro de resúmenes 3, congreso Pontificia Universidad Liberiana. Colombia, Tomo II, pp 565.
  
8. **GONZALES Ana M. Y RACIMAN JORGE S. 2003**. Fitoreguladores de crecimiento. Internet, [http://perso.wanadoo.es/pedrogruen/hormonas\\_gegetales\\_y\\_reguladore.htm](http://perso.wanadoo.es/pedrogruen/hormonas_gegetales_y_reguladore.htm).
  
9. **HARTMANN Y KESTER. (1991)**, Propagación de plantas. Editorial Continental S.A. México Pág. 550 – 618.
  
10. **HELGFOHG, SALOMÓN. (1 992)**. La Caña de Azúcar en la Costa Peruana. Editorial Salazar. Lima – Perú. 560 pp.
  
11. **HURTADO D. y MERINO (1 988)**, “Cultivo de tejidos vegetales” Edit. Trillas, México, p. 67.
  
12. **LEON MARTINEZ Marco (1 995)**, “Conservación de especies peruanas de orquídeas utilizando técnicas de cultivo de tejidos In Vitro”, Facultad de ciencias, Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú.
  
13. **LUCAS C. (2 001)**, “BIOTEC” biotecnología vegetal, pagina electrónica gratuita, [elucas42@Hotmail.com](mailto:elucas42@Hotmail.com).

14. **MARTIN, J. – et al. (1 987)** La Caña de Azúcar en Cuba. Editorial Científica Técnica. La Habana – Cuba. 612 p.
15. **MEJIA ANAYA Rubio, (1 994)**, “Agrobiotecnología: fundamentos y aplicaciones”, Universidad Nacional Agraria de la Molina. Propagación comercial de 312 especies por cultivo *In Vitro*. 18 – 27 pp.
16. **RIZZO PASTOR Pablo, (1 999)**, Proceso de producción de vitroplantas de caña de azúcar en Ecuador en el ingenio “la Troncal”, publicación electrónica.
17. **ROCA William (1 991)**, “Cultivo de tejidos en la agricultura”, fundamentos y aplicaciones, CIAT, pp. 545- 547.
18. **SANTANA J. (2 001)**, “Ensayo comparativo de cuatro variedades de caña propagadas mediante la técnica de cultivos vegetales” revista científica de EEAOC. INICA, Cuba 1995 – 9.
19. **TOLEDO ESPINOZA Judith. (2 003)**, “Biología aplicada a la caña de azúcar”, Primer seminario de Agro industrialización de la caña de azúcar y sorgo dulce en la región San Martín.



## XI. ANEXO.

Foto N° 01 y 02: preparación de medios de cultivo para caña de azúcar.

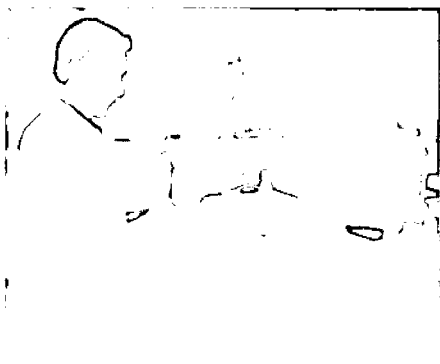


Foto 01



Foto 02

Foto N° 03 , 04 y 05: Obtención del explante inicial lavado y desinfección.

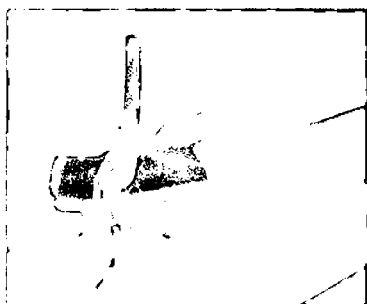


Foto 03



Foto 04

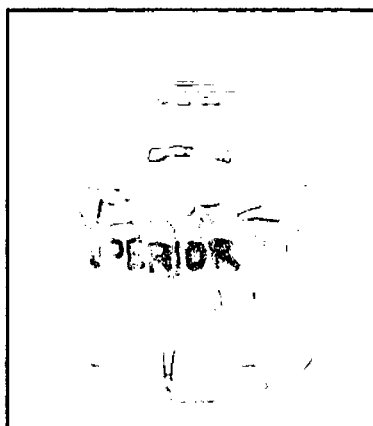


Foto 05

Foto N° 06 y 07 : Extracción y obtención del meristemo.



Foto 06

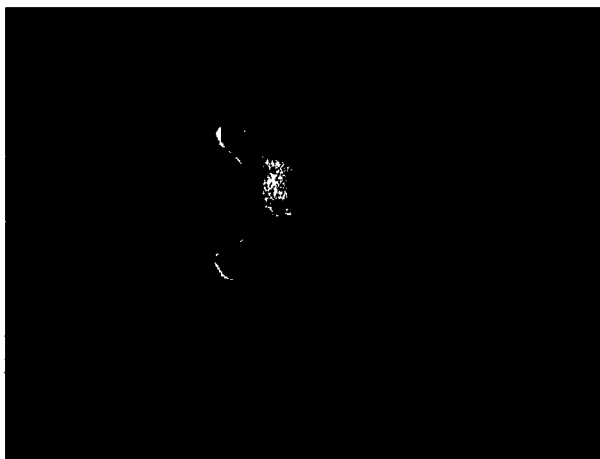


Foto 07

Foto Nª 08: Plántulas de caña en los respectivos tratamientos

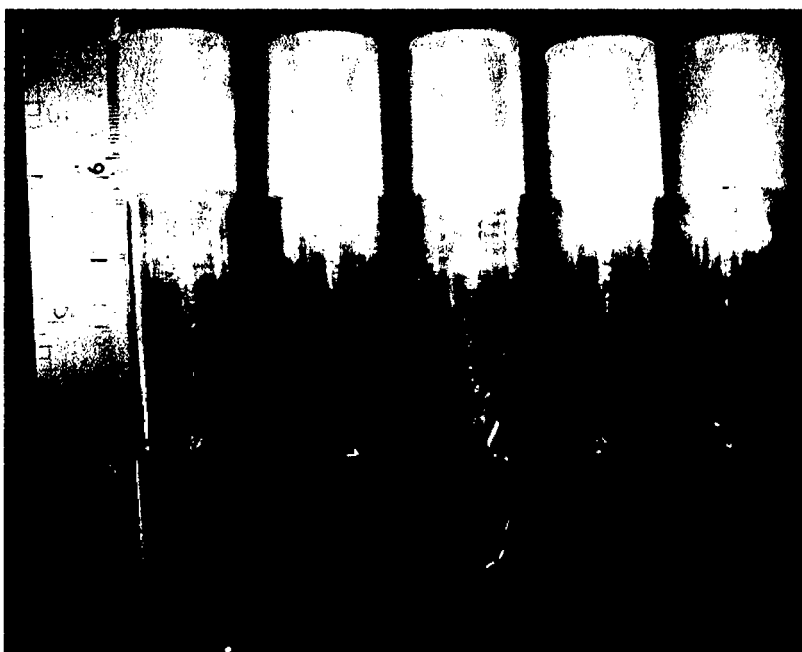


Foto 08

**Foto N° 09 : Personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la UNSM.**

