

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



EVALUACIÓN DE CUATRO DOSIS DE ÁCIDO 2,4-  
DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) COMO PROMOTOR DE  
LA REGENERACIÓN DE PLANTAS EN DOS VARIEDADES  
DE CAÑA DE AZÚCAR.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por Odette Migdalia Azucena Pinzón Méndez para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Tecnología Agrícola y Pecuaria.

Guatemala  
2017



EVALUACIÓN DE CUATRO DOSIS DE ÁCIDO 2,4  
DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) COMO PROMOTOR DE  
LA REGENERACIÓN DE PLANTAS EN DOS VARIEDADES  
DE CAÑA DE AZÚCAR.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



EVALUACIÓN DE CUATRO DOSIS DE ÁCIDO 2,4-  
DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) COMO PROMOTOR DE  
LA REGENERACIÓN DE PLANTAS EN DOS VARIEDADES  
DE CAÑA DE AZÚCAR.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por Odette  
Migdalia Azucena Pinzón Méndez para optar al grado académico de  
Licenciada en Ingeniería en Tecnología Agrícola y Pecuaria.

Guatemala  
2017

Vo. Bo:

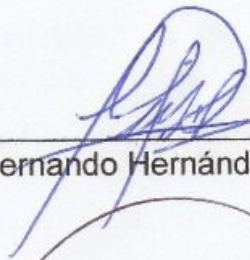
Luis Molina

(f) \_\_\_\_\_  
(Dr. Luis Gerardo Molina Monterroso)

Tribunal Examinador:

Luis Molina

(f) \_\_\_\_\_  
(Dr. Luis Gerardo Molina Monterroso)



(f) \_\_\_\_\_  
(Ing. Fernando Hernández Hernández)



(f) \_\_\_\_\_  
(Ing. Elmer Vitelio Salazar Barrios)

Fecha de aprobación: Guatemala 4 de abril 2017

## PREFACIO

La elaboración de la presente tesis surgió del interés personal de profundizar y aportar documentación, para futuros proyectos en el área de biotecnología de caña de azúcar. Durante el transcurso de mi carrera, siempre mostré un especial interés en realizar investigaciones sobre temas relacionados a la contribución de nuevas metodologías que tuvieran como objetivo mejorar las prácticas experimentales. De esta manera, mi principal reto en esta investigación, además de obtener resultados satisfactorios, consistió en adquirir la habilidad de la utilización de herramientas, equipo de laboratorio, utilización adecuada de los reactivos y como evitar los problemas de contaminación por bacterias u hongos, causados por una inadecuada práctica. Las frecuentes contaminaciones al principio del proyecto causaron dificultades; sin embargo, conforme la práctica se fue mejorando, y el problema de contaminación por bacterias u hongos se redujo. Observando que, al principio, las prácticas de todo el procedimiento se hacían de manera inadecuada, fue necesario cambiarlas y observar si se obtenían resultados satisfactorios.

Esto demostró que el quehacer científico, incluye prueba y error, para lograr establecer procedimientos con aportes valederos. De la misma manera, este contenido ha de servir de orientación a las generaciones actuales o de base, para todos aquellos que lo quieran acrecentar. Asimismo, debo señalar que: la definición y delimitación del tema de tesis, lo realicé gracias a la oportunidad que tuve, al llevar a cabo el proyecto de investigación en el área de Biotecnología de Cengicaña, denominado: *Evaluación de cuatro dosis de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-d) como promotor de la regeneración de plantas en dos variedades de caña de azúcar.*

De la misma manera agradezco con todo el respeto y aprecio que se merecen, a todos los que me ayudaron para presentar este trabajo, porque sin ellos y sin la ayuda de Dios, no hubiera sido posible. De la misma manera, quiero patentizar mi agradecimiento muy especialmente, a la Universidad del Valle-Campus Sur (UVG CAMPUS SUR), al Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de Caña de Azúcar (CENGICAÑA), al Dr. Mario Melgar, al Dr. Luis Molina, al Ing. Victoriano Sut y al perito agrónomo Pablo Camargo, por sus grandes aportes, los cuales permitieron y allanaron el camino para el logro de mis metas y culminación exitosa, del presente trabajo de graduación.

## CONTENIDO

	Página
PREFACIO.....	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE ILUSTRACIONES .....	xi
LISTA DE GRÁFICAS.....	xiv
RESUMEN .....	xv

### Capítulos

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	2
A. GENERAL .....	2
B. ESPECÍFICOS .....	2
III. JUSTIFICACIÓN .....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
A. Importancia de la caña de azúcar: .....	4
B. Desarrollo de variedades de caña de azúcar en Guatemala:.....	7
C. Uso de la biotecnología en el mejoramiento de la caña de azúcar: .....	10
D. Cultivo de tejidos:.....	10
E. Uso de reguladores de crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales: .....	13
F. Las auxinas:.....	13
G. Efectos de las auxinas sobre las raíces y su formación:.....	14
H. Citocininas .....	15

I. Giberelinas.....	15
V. ANTECEDENTES .....	16
A. Período de inducción con auxina promotora de la regeneración de la caña de azúcar ( <i>Saccharum spp.</i> ) con explantes de disco foliar .....	16
VI. MARCO METODOLÓGICO .....	18
A. Características: .....	18
B. Variedades a utilizar: .....	18
C. Materiales o instrumentos: .....	19
D. Equipo:.....	19
E. Preparación de soluciones concentradas para elaborar medio de cultivo: .....	20
F. Preparación de medio de inducción:.....	21
G. Procedimiento para preparar medio de inducción (fase 1):.....	23
H. Procedimiento para la siembra de discos foliares (fase 1) .....	23
I. Procedimiento para preparar medio ms de regeneración (fase 2) .....	25
J. Procedimiento para la siembra de explantes en el medio de regeneración .....	26
VII. RESULTADOS .....	28
A. Fase 1 (Inducción) .....	28
B. Fase 2 (Regeneración) .....	28
1. Experimento 1:.....	28
a. Porcentaje de regeneración: .....	28
b. Plantas regeneradas por explante:.....	30
2. Experimento 2:.....	31
a. Porcentaje de regeneración: .....	31
b. Plantas regeneradas por explante:.....	34

1. Experimento 3:.....	37
a. Porcentaje de regeneración: .....	37
b. Plantas regeneradas por explante:.....	39
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	41
IX. CONCLUSIONES.....	43
X. RECOMENDACIONES .....	44
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (MARGEN) .....	45
XII. APÉNDICE .....	47
A. Resultados de experimentos .....	47
B. Procesos extras: .....	51
1. Proceso de esterilización de pinzas, frascos, cajas Petri y agua desmineralizada: .....	51
2. Proceso de lavado de cristalería e instrumentos: .....	51
3. Proceso de esterilizado de cámara de flujo: .....	51
C. Laboratorio de biotecnología de Cengicaña: .....	52
1. Normas del laboratorio de Biotecnología: .....	52

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Influencia del periodo de pretratamiento con 2,4-D en la regeneración de segmentos de nervadura central en la variedad CoC671 de Caña de Azúcar .....	17
2.	Preparación de 1 l de solución concentrada de macromelementos .....	20
3.	Preparación de 1 l de solución concentrada de microelementos 100X .....	20
4.	Preparación de soluciones concentradas de hierro, vitaminas y sulfato de cobre .....	20
5.	Preparación de soluciones concentradas de BAP, ANA y 2,4-D. ....	22
6.	Cantidad de ingredientes a utilizar en la preparación de diferentes volúmenes de medio de inducción (Fase 1) .....	21
7.	Volúmenes de solución de 2,4-D que se debe agregar a 200 ml de medio de inducción de acuerdo con los tratamientos para la fase 1 .....	22
8.	Cantidad de ingredientes a utilizar en la preparación de diferentes volúmenes de medio MS de regeneración (Fase 2) .....	22
9.	Análisis de varianza para la variable porcentaje de regeneración (datos transformados a $\log_{10}$ ), variedad CP73-1547, experimento 1 .....	29
10.	Análisis de varianza para la variable plantas regeneradas por explante (datos transformados a $\log_{10}$ ), variedad CP73-1547, experimento 1 .....	30
11.	Análisis de varianza para la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2 .....	32

12. Análisis de varianza para la variable plantas por explante, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2 .....	34
13. Análisis de varianza para la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 3 .....	39
14. Análisis de varianza para la variable porcentaje de regeneración, variedades CP72-2086, experimento 3 .....	40
15. Resultados de experimento 1, variedad CP73-1547 .....	47
16. Resultados de experimento 2, variedad CP73-1547 y CP72-2086 .....	48
17. Resultados de experimento 3, variedad CP73-1547 y CP72-2086 .....	52
18. Distribución de áreas del laboratorio de Biotecnología .....	52
19. Indicaciones y precisiones de áreas del laboratorio de Biotecnología .....	53

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración	Página
1. Porcentaje de exportación por región zafra 2012/13 .....	4
2. Ubicación geográfica de la zona cañera de la costa sur .....	6
3. Área cultivada con caña de azúcar y área censada por su composición varietal a zafra 2015-16 en Guatemala .....	7
4. Comportamiento de once variedades comerciales utilizadas en Guatemala a través de distintos estratos altitudinales .....	8
5. Segmento de nervadura central cultivadas continuamente en medio de inducción con callo embriogénico .....	16
6. Instrumentos de trabajo utilizados. (1) Erlenmeyer de 200 ml (2) Agitadores magnéticos. (3) Espátulas pequeñas. (4) Beaker de 200 ml y 1000 ml (5) Probeta de 100 ml y 1000 ml (6) Pipeta de 5 ml (7) Pipeta de 1 ml (8) Pichel de 1 l (9) 2 Goteros. (10) Papel aluminio. (11) Mechero de alcohol. (12) Tape especial para autoclave. (13) Bandeja de metal. (14) Guantes de neopreno. (15) Cajas Petri estériles. (16) Bisturí. (17) Parafilm. (18) Tijera. (19) Pinzas. (20) Plástico adhesivo. (21) Cronómetro .....	19
7. Equipo utilizado. (A) Balanza. (B) Potenciómetro. (C) Plancha agitadora. (D) Incubadora. (E) Cámara de flujo laminar. (f) Refrigerador. (G) Autoclave .....	19
8. Sales minerales(A) Ingredientes sólidos. (B) Ingredientes líquidos .....	21
9. Solución de 2,4-D con una concentración de 0.5 mg/ml .....	22
10. Procedimiento:(A) Mezcla de sales minerales. (B) Separación de 1l en beaker de 200 ml (C) Medición y colocación de diferentes dosis de 2,4-D. (D) Medición de pH (E) Traslado de solución de beaker a Erlenmeyer y autoclaveado durante 20	

minutos. (F) Preparación de cajas Petri en cámara de flujo laminar, para servir el medio. (G) Etiquetado de tratamientos .....	23
11. Procedimiento de siembra en medio de inducción. (A) Preparación de cajas Petri con medio de inducción y vástagos desinfectados con cloro al 2.5%. (B) Desprendimiento de 2 a 3 hojas del vástago. (C) Flameado de bisturí y de pinzas. (D) Corte de disco con ayuda de herramientas. (E) Vista de explantes de un disco foliar. (F) Sellado de caja Petri con parafilm .....	25
12. Procedimiento para preparar medio MS de regeneración. (A) Mezcla de sales minerales. (B) Medición de pH (C) Colocación del medio en autoclave durante 5 minutos, posteriormente se traslada a frascos y se coloca en autoclave durante 15 minutos más. (E) Almacenamiento de frascos con medio de regeneración .....	26
13. Siembra de explantes al medio de inducción a medio de regeneración. (A) Preparación de cámara de flujo. (B) Visualización de hojas y venas foliares en medio de inducción. (C) Traslado de hojas y venas a medio de regeneración. (D) Visualización de hojas y venas foliares en medio de regeneración .....	29
14. Fase 1 después de 8 días en tratamiento de inducción con 2,4-D (A) Explantes separados de un disco foliar provenientes del vástago de caña de azúcar. (B) Vena foliar. (C) Lámina foliar. (D) explantes trasladados a medio de regeneración .....	28
15. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 3 mg/l (D) 4 mg/l (E) 5 mg/l Variedad CP72-1547, experimento 1 .....	29
16. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 4 mg/l (D) 5 mg/l Variedad CP72-1547, experimento 2 .....	31
17. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 4 mg/l (D) 5 mg/l Variedad CP73-2086, experimento 2 .....	32

18. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 3 mg/l (D) 4 mg/l (E) 5 mg/l Variedad CP72-1547, experimento 3 .....	38
19. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 3 mg/l (D) 4 mg/l (E) 5 mg/l Variedad CP73-2086, experimento 3 .....	38
20. Distribución de áreas del laboratorio de Biotecnología. (A) Área de materiales y equipos contra incendios. (B) Área de señal de advertencia. (C) Área de salvamento o de auxilio .....	53

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráficas	Página
1. Porcentaje de regeneración de los explantes de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento 1 .....	30
2. Plantas regeneradas por explante de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento 1 .....	31
3. Porcentaje de regeneración de los explantes de la interacción tratamiento por variedad de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2 .....	33
4. Resultados. (A) Porcentaje de regeneración de los explantes de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento2. (B) Medias de tratamientos de la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2 .....	34
5. Plantas regeneradas por explante de la interacción tratamiento por variedad de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2 .....	36
6. Resultados. (A) Plantas regeneradas por explante, de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento2. (B) Medias de tratamientos de la variable plantas regeneradas por explante, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2 .....	37
7. Resultados. (A) Porcentaje de regeneración de los explantes de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento3. (B) Medias de tratamientos de la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 3 .....	39
8. Resultados. (A) Número de plantas regeneradas por explante, de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento3. (B) Medias de tratamientos de la variable plantas regeneradas por explante, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 3 ..	40

## RESUMEN

Dentro de las instalaciones de CENGICAÑA, en el área de Biotecnología, se realizaron 3 experimentos bajo condiciones controladas, con el fin de adaptar una metodología de regeneración de plantas in vitro, utilizando diferentes dosis de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como inductor de la regeneración y segmentos de hoja como explantes provenientes de dos variedades: CP73-1547 y CP72-2086. Estos experimentos constaron de dos etapas, en la primera (fase de inducción), los explantes fueron expuestos durante ocho días a cuatro concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo: 2, 3, 4 y 5 mg/l. Posteriormente, en la segunda etapa (fase de regeneración), los explantes se trasladaron a un medio de regeneración durante 60 días, con 16 horas de luz y una temperatura de 25 °C. Los medios en esta segunda etapa se diferenciaron por su contenido de reguladores del crecimiento, BAP (0.1 mg/l) y ANA (0.1 mg/l) en los experimentos 1 y 2, mientras que en el experimento 3, el medio de regeneración estuvo libre de estos compuestos. Al finalizar esta segunda etapa, se comparó la respuesta a los factores evaluados, en términos del porcentaje de regeneración y el número de plantas regeneradas por explante. En el experimento 1, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. El porcentaje de regeneración varió 0 % y 30 % y el número de plantas regeneradas por explante, entre 0 y 7. En el experimento 2, la interacción de dosis y variedad mostró que CP72-2086 tuvo mayor regeneración de plantas (33.75 %) con la dosis de 2 mg/l, mientras que CP73-1547 tuvo la menor respuesta con esa misma dosis (2.5 %). De igual manera se manifestó esta interacción con el número de plantas por explante, donde, además, la variedad CP72-2086 presentó mayor respuesta que CP73-1547, con 4.28 y 2.19 plantas, respectivamente. En el experimento 3, el porcentaje de regeneración entre las dosis se mostró similar, diferenciándose solamente del tratamiento control y la variedad CP73-1547 tuvo una mayor respuesta (25.33 %) que la variedad CP72-2086 (4.67 %). El número de plantas por explante no se mostró significativamente diferente entre los tratamientos y variedades.

## I. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum spp.*) es uno de los principales cultivos del país, siendo este de vital importancia para todos aquellos ingenios azucareros del área, por tal razón es imprescindible la realización de investigaciones que ayuden alcanzar el máximo rendimiento posible en sus procesos. Con esa finalidad, la Asociación de Azucareros de Guatemala (ASAZGUA) creó el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), institución en el cual se realizó el presente trabajo, específicamente en el Área de Biotecnología.

La regeneración de plantas mediante cultivo *in vitro* es una técnica que ha demostrado ser de utilidad en los programas de mejora genética de los cultivos. A través de sus múltiples aplicaciones facilita la propagación clonal y el intercambio varietal, se pueden obtener plantas libres de enfermedades a partir de plantas infectadas, permite la conservación de germoplasma recalcitrante o de propagación asexual, permite la obtención de variantes útiles y la implementación de métodos de selección a nivel de células y tejidos y de sistemas de análisis fisiológico. Además, el desarrollo de protocolos eficientes de regeneración *in vitro* ha permitido una manipulación genética más precisa a través de ingeniería genética.

Mucha de la investigación básica con relación a biotecnología se ha desarrollado en universidades y centros de investigación de países desarrollados. En CENGICAÑA se aprovecha ese conocimiento para adaptar e implementar las técnicas que puedan tener uso práctico en la consecución de sus objetivos. Una de estas metodologías ya desarrolladas, consiste en la utilización de la auxina denominada ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), como inductor de la regeneración de plantas a partir de segmentos de hoja.

Se pretende determinar a través de esta investigación, el efecto inductor de cuatro diferentes dosis de 2,4-D sobre la regeneración de plantas en dos variedades de uso comercial en Guatemala, CP72-2086 y CP73-1547, lo cual nos permitirá afinar la técnica y adaptarla a nuestras variedades.

## **II. OBJETIVOS**

### **A. GENERAL**

Evaluar el efecto de cuatro dosis de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como promotor de la regeneración de plantas en dos variedades de caña de azúcar.

### **B. ESPECÍFICOS**

1. Registrar el efecto de cuatro concentraciones de 2,4-D sobre el porcentaje de explantes con regeneración de plantas.
2. Determinar el efecto de cuatro concentraciones de 2,4-D sobre el número de plantas regeneradas por explante.
3. Comparar la respuesta a la regeneración de plantas en dos variedades comerciales de caña de azúcar.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Considerando que la técnica recién implementada en CENGICAÑA se basa en un trabajo realizado con variedades de otros países, es posible que se pueda maximizar la respuesta en variedades locales, mediante la modificación de algunos factores y la medición de su efecto sobre la regeneración de plantas. Lo anterior nos permitirá aplicar de manera más eficiente la técnica de cultivo de tejidos, como apoyo a la mejora genética de la caña de azúcar, lo que a su vez puede aumentar la productividad del cultivo, mediante el uso de nuevas y mejores variedades en la agroindustria azucarera de Guatemala.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Importancia de la caña de azúcar:

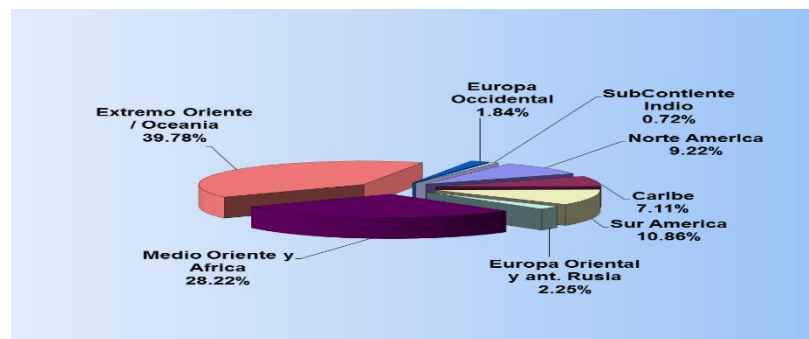
La caña de azúcar (*Saccharum sp.*) es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado en el ingenio forma el azúcar. (Perafán, 2009)

La agroindustria azucarera guatemalteca representa el 31 % del valor total de la exportación agrícola guatemalteca y 15.36 % de las exportaciones totales del país. Es el sector económico que más divisas genera en nuestro país. Durante el año 2013, el azúcar y la melaza produjeron un ingreso de US\$978.1 millones (ASAZGUA, 2012).

La caña de azúcar, es probablemente el cultivo más valioso del mundo, valuado en aproximadamente US\$ 143 mil millones por año. Cerca del 75 % de la producción mundial de sacarosa proviene de la caña de azúcar que es cultivada en más de 100 países. Es, además, el cultivo industrial más cercano a la sostenibilidad como fuente renovable de energía. La producción mundial de caña de azúcar durante el año 2015-2016 se estimó en 110 mil millones de toneladas, en un área de 23.8 millones de hectáreas (Molina, 2012).

Guatemala es el cuarto mayor exportador de azúcar en el mundo y el tercero en producción por hectárea. El azúcar representa el 10.38 % de las exportaciones totales del país y el 20.95 % de las exportaciones agrícolas, generando US\$ 505.3 millones en ingreso de divisas durante el año 2011 (Molina, 2012).

*Ilustración 1. Porcentaje de exportación por región zafra 2012/13.*



(ASAZGUA, 2012).

De acuerdo con (ASAZGUA, 2012), estos logros se han alcanzado gracias a que el azúcar de Guatemala cuenta con:

- Cumplimiento de los contratos adquiridos.
- La calidad del azúcar (polarización, color, humedad, etc.) ha cumplido y superado los estándares mundiales.
- La eficiencia de la terminal de embarque Expo granel.

Posicionamiento de Guatemala en: América Latina y el Caribe

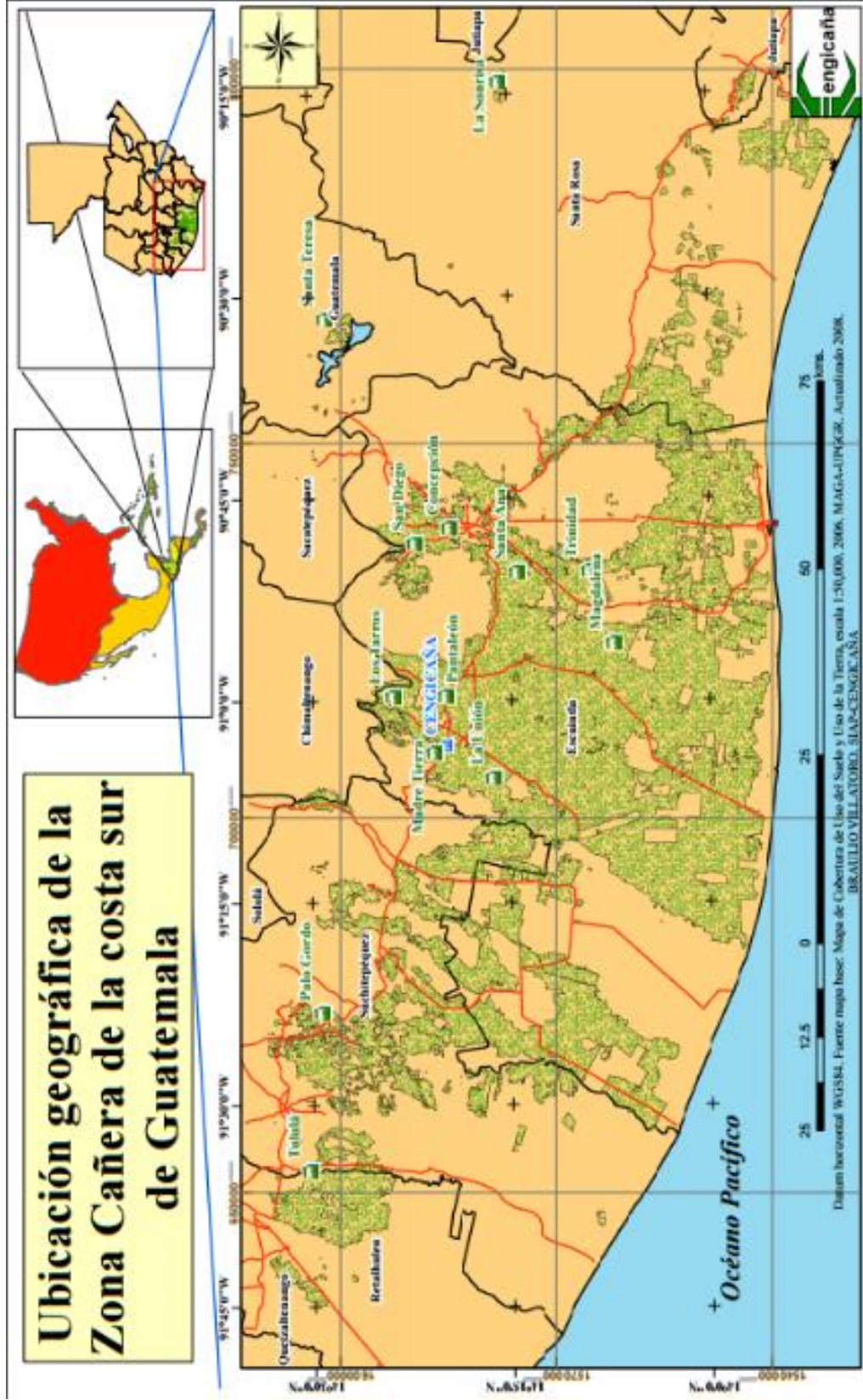
- 2º. Exportador
- 4º. productor

A nivel mundial

- 4º. exportador
- 3º. Productor por hectárea

Guatemala exporta alrededor del 72% de su producción total, siendo los principales mercados de exportación para el azúcar crudo: Estados Unidos 18.0%, Corea del Sur 9.8%, México 9.5%, y Chile 8.4%. (ASAZGUA, 2012)

Ilustración 2. Ubicación geográfica de la zona cañera de la costa sur



(Cengicaña, 2012)



La Ilustración 3 muestra la composición varietal de la Agroindustria Azucarera de Guatemala para la zafra 2015 - 2016 a nivel general y de los estratos altitudinales. En el nivel general en la zafra 2015-16, 11 variedades de caña de azúcar se cultivan comercialmente con más del uno por ciento del área, ocupando el 87.3 % del área total. Esta distribución no es la más adecuada si se toma como base la sugerencia de que esta proporción de área debería de estar ocupada por seis variedades y en áreas más o menos equitativas. Para la zafra 2015-16 las primeras seis variedades ocupan el 78.4 %; sin embargo, pareciera que la Agroindustria Azucarera de Guatemala está dando pasos hacia la distribución varietal ideal que se tuvo a inicios de los años de 1980. (Orozco, 2016)

De las once variedades tres son de maduración natural temprana, CP73-1547, CG98-46 y CG00-102, dos variedades intermedias CP72-2086 y CP88-1165, una variedad de maduración intermedia tardía CG98-78 y cinco variedades tardías Mex79-431, CG98-10, RB73-2577, SP71-6161 y SP79-1287. Las variedades tempranas ocupan el 18.6 %, las variedades intermedias el 47.3 % y las variedades tardías 14.0 %. Este resultado ilustra que en la Agroindustria Azucarera de Guatemala no existe todavía un balance adecuado entre los diferentes tipos de maduración natural para cosecha durante los meses y los tres tercios de zafra. La situación anterior indica que variedades de maduración natural intermedia se están cosechando inadecuadamente tanto en el inicio como al final del periodo de cosecha.

Otro aspecto importante en cuanto a las once variedades comerciales es resaltar, como se observa en la Ilustración 4, que no todas las variedades tienen adaptabilidad a los cuatro estratos altitudinales con excepción de las variedades CP73-1547 y CP88-1165 el resto tienen adaptabilidad a uno, dos o tres estratos altitudinales.

*Ilustración 3. Comportamiento de once variedades comerciales utilizadas en Guatemala a través de distintos estratos altitudinales.*

Variedades	Industria				Estratos altitudinales							
	(ha)	%	% Acumulado	Maduración Natural	Alto		Medio		Bajo		Litoral	
					(ha)	%	(ha)	%	(ha)	%	(ha)	%
CP72-2086	71,304	33.4	33.4	Intermedia	320	3.1	15,561	25.5	18,659	38.7	36,764	39.2
CP73-1547	32,919	15.4	48.9	Temprana	1,771	17.1	11,529	18.9	6,231	12.9	13,388	14.3
CP88-1165	29,655	13.9	62.8	Intermedia	3,000	29.0	9,973	16.3	5,333	11.1	11,349	12.1
CG98-78	15,646	7.3	70.1	Intermedia-Tardía	299	2.9	7,782	12.7	3,411	7.1	4,155	4.4
Mex79-431	9,577	4.5	74.6	Tardía	436	4.2	4,042	6.6	1,396	2.9	3,704	4.0
CG98-10	8,119	3.8	78.4	Tardía	342	3.3	2,797	4.6	830	1.7	4,150	4.4
SP71-6161	4,169	2.0	80.3	Tardía	41	0.4	285	0.5	645	1.3	3,199	3.4
SP79-1287	4,032	1.9	82.2	Tardía	14	0.1	191	0.3	1,256	2.6	2,571	2.7
CG98-46	3,924	1.8	84.1	Temprana	213	2.1	1,209	2.0	683	1.4	1,820	1.9
RB73-2577	3,860	1.8	85.9	Tardía	50	0.5	606	1.0	1,393	2.9	1,811	1.9
CG00-102	3,036	1.4	87.3	Temprana	114	1.1	583	1.0	954	2.0	1,386	1.5

(Orozco, 2016)

Los incrementos en producción desde el siglo XIX se han asentado en un continuo abastecimiento de cultivares mejorados que satisfacen los requerimientos de las industrias azucareras alrededor del mundo. La mayoría de estas industrias financia programas de mejoramiento para incrementar su productividad, mediante el incremento directo del rendimiento de azúcar, a través del incremento en el rendimiento de caña y de contenido de azúcar, e indirectamente por la incorporación de resistencia genética para las principales enfermedades y plagas. (Molina, 2012)

Como se ha comentado anteriormente se han desarrollado programas para aumentar el rendimiento de azúcar, a través del mejoramiento en el contenido de azúcar y del rendimiento de caña; sin embargo, la obtención de materiales con resistencia genética a enfermedades es muy importante para alcanzar indirectamente el incremento en el rendimiento de azúcar. La obtención de variedades resistentes implica el desarrollo y aplicación de métodos adecuados de selección y diagnóstico para las principales enfermedades que afectan al cultivo. (Molina, 2012)

Debido a esta necesidad se ha ido creando sistemas que permitan a las variedades resistencia mediante mejoramiento de caña de azúcar

El mejoramiento de la caña de azúcar a través de manipulación genética ha sido un proceso dirigido y continuo desde 1888, tras la observación en 1858 de que la caña de azúcar producía semilla viable. Los destrozos causados por enfermedades en Java motivaron a los holandeses a encontrar medidas de control, lo que resultó en programas de mejora y selección que fueron los precursores de los exitosos programas de mejoramiento actuales. La mayoría de las áreas productoras de caña de azúcar cuenta con programas de mejoramiento para desarrollar variedades de adaptación local. (Molina, 2012)

El mejoramiento genético de las plantas tiene como objetivo modificar y aprovechar la variación genética con el propósito de obtener variedades que satisfagan las necesidades del hombre en circunstancias determinadas. El Programa de Variedades de CENGICAÑA realiza el mejoramiento genético de la caña de azúcar enfocado a contribuir al incremento de la productividad de azúcar a través de la generación y/o adaptación de variedades de alto tonelaje de caña y rendimiento de azúcar, adaptables a las diferentes condiciones ambientales, con resistencia a las enfermedades y las plagas más comunes, así como adecuadas características agronómicas que influyen en la composición varietal, cosecha, fabricación y otros. (Orozco *et. al.*, 2005).

### **C. Uso de la biotecnología en el mejoramiento de la caña de azúcar:**

Las técnicas utilizadas en el mejoramiento de los cultivos se han venido refinando y la biotecnología con sus aplicaciones ha venido a contribuir con esta actividad y en países en desarrollo como Guatemala ya hemos comenzado a utilizarla, principalmente en la mejora genética de caña de azúcar. Dentro de las técnicas más comunes que se vienen implementando están el cultivo de tejidos y el uso de marcadores moleculares. (Molina, 2012)

Existen varias definiciones de biotecnología, pero, según el Convenio para la Diversidad Biológica, es “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos” (Molina, 2012)

Estos objetivos de mejoramiento responden al prototipo varietal requerido por la agroindustria azucarera guatemalteca. Todos estos objetivos requieren del manejo de un gran número de materiales, de metodologías apropiadas de selección y de metodologías que permitan comprobar el estado sanitario de las plantas en determinadas fases del proceso, es decir la ausencia de patógenos en los materiales que se van a utilizar. Puesto que la propagación de los materiales es vegetativa, y muchos de ellos son sensibles a patógenos que afectan a este cultivo, el desarrollo de protocolos que permitan el saneamiento de material infectado es una necesidad. (Molina, 2012)

### **D. Cultivo de tejidos:**

La visión, el establecimiento del propósito y el potencial del cultivo de células y tejidos aislados se atribuyen al botánico alemán Gottlieb Haberlandt en el año 1902; sin embargo, no logró demostrar sus ideas con sus experimentos. El fundamento de la técnica reside en el concepto de la totipotencia celular, es decir, la capacidad que tiene una célula para dividirse y formar una planta completa. Philip Rodney White, en los Estados Unidos, Roger Gautheret y Pierre Nobécourt, en Francia, durante la década de 1930, fueron los primeros que lograron el crecimiento de tejidos vegetales en cultivo, por períodos indefinidos de tiempo. (Molina, 2012)

El cultivo de tejidos –en su acepción amplia– puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos – células desprovistas de pared celular– células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición

química definida y se incubaba en condiciones ambientales controladas. La imprecisión de esta definición puede generar muchas polémicas, pero es actualmente aceptada. Generalmente es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos: a) cultivos en medios semisólidos y b) cultivos en medios líquidos, los que a su vez pueden ser agitados (mediante el empleo de agitadores de uso continuo) o estacionarios. También es frecuente dividir al cultivo de tejidos atendiendo a los niveles de complejidad en cultivo de órganos, cultivos celulares y cultivo de protoplastos. (Molina, 2012)

Las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas pueden utilizarse con fines muy diversos como son la producción de material vegetal libre de patógenos, la micropropagación, la conservación de germoplasma, la transformación genética, la selección de mutantes, la hibridación somática o el aprovechamiento de la variación somaclonal. En el caso de la caña de azúcar se ha trabajado con todas estas metodologías, las cuales requieren en su mayoría de la regeneración de plantas a partir de explantes. Esa regeneración puede producirse en la caña de azúcar por la vía organogénica o a través de la embriogénesis somática. A su vez, cada una de estas vías puede ser, directa o indirecta. (Molina, 2012)

Para el establecimiento de los cultivos utilizando cualquiera de los sistemas es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación. (Levtius *et al.*, 2004)

La edad fisiológica es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho genera la necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donantes de explantes. (Levtius *et al.*, 2004)

El continuo crecimiento y división de células, que no se diferencian en ningún órgano o tejido específico, forma masas celulares a las que se les denomina callo. Heinz y Mee en 1969, fueron los primeros en regenerar plantas a partir del callo en caña de azúcar. El callo se indujo en tejido de parénquima de brotes apicales, hojas e inflorescencias, usando un medio mineral base, al cual agregaron agua de coco (10 %) y 2,4-D. La regeneración se obtuvo al transferir el tejido de callo a un medio sin 2,4-D. (Franklin *et al.*, 2006)

A partir de diversos explantes, considerando un explante como cualquier parte de la planta, las plantas de caña de azúcar pueden regenerarse de forma directa o indirecta. La forma indirecta implica la formación inicial del callo y la posterior regeneración de plantas. (Franklin *et al.*, 2006)

Se ha reportado la regeneración directa a partir de segmentos de hojas jóvenes y regeneración indirecta a partir de callo proveniente de semillas germinadas, de primordios foliares y de meristemos apicales. (Franklin *et al.*, 2006)

La regeneración de plantas de caña de azúcar puede ocurrir a través de organogénesis, como el caso que se cita en el párrafo anterior, o a través de embriogénesis somática. Ho & Vasil en 1983, indujeron la formación de callo embriogénico en segmentos de hojas jóvenes de caña de azúcar cultivadas en un medio de Murashige y Skoog (MS). (Franklin *et al.*, 2006)

El callo embriogénico se forma por divisiones en células del mesófilo, situadas principalmente en la mitad abaxial de la hoja y también de células del parénquima vascular. Los embrioides se desarrollaron por divisiones internas en células individuales ricas en citoplasma, localizadas en la periferia del callo embriogénico y mostraron la organización típica de los embriones de gramíneas. Aunque, la embriogénesis es eficiente y reproducible, permanece largos y laboriosos. El mantenimiento de callo en medio con 2,4-D puede aumentar la probabilidad de la variación somaclonal. (Franklin *et al.*, 2006)

La organogénesis directa involucra la regeneración de tallos a partir de meristemos apicales o cortes de hojas inmaduras, tras la exposición a por lo menos una citocinina (benciladenina y cinetina) y una auxina (ácido naftalenacético: ANA) a una alta relación citocinina/auxina. En seguida, se induce el enraizamiento con la aplicación de la auxina ácido indolbutírico o con la remoción de los reguladores del crecimiento del medio de cultivo y la adición de sacarosa. También es posible inducir organogénesis directa en condiciones de iluminación constante, sólo en presencia de ácido naftalenacético o indirectamente por medio de regeneración, a partir de callos que generen meristemos en respuesta a auxinas (para la formación de tallos) y citocininas (para la formación de raíces). El enraizamiento de los explantes se estimula al retirar las auxinas del medio, remover las hojas o exponer el cultivo a por lo menos 15 °C, por cuatro a seis semanas. Las respuestas de los genotipos de caña pueden variar y en general es necesario optimizar los medios en cuanto a concentraciones y balance de reguladores de crecimiento. (Castro, 2013)

## **E. Uso de reguladores de crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales:**

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y translocados a otra parte donde, en concentraciones muy bajas, produce una respuesta fisiológica. En la propagación de plantas, las hormonas vegetales tienen gran importancia ya que no sólo son parte del mecanismo interno que regula la función vegetal, sino que ellas pueden inducir una respuesta específica en el cultivo. (Agvik, 2011)

También existen ciertas sustancias químicas, algunas naturales y otras sintéticas, que muestran efectos hormonales en plantas, éstos son clasificados como reguladores de crecimiento vegetal. Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y las citocininas las cuales controlan la formación de la raíz, del tallo y el callo.

## **F. Las auxinas:**

Grupo de hormonas vegetales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. La auxina estimula la iniciación de raíces en tallos, pero puede inhibir o reducir el crecimiento subsecuente de las raíces. (Agvik, 2011)

Existen varias auxinas llamadas naturales, que incluyen el AIA, compuesto de mayor utilización. También se utiliza un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente, entre las cuales 2,4-D, el ANA y el AIB que se utilizan comúnmente. (Agvik, 2011)

El 2,4-D ejerce profundos efectos sobre la respiración celular, el consumo de azúcares y en el control de la división celular, por ello se especula acerca de su rol indirecto en la inducción de cambios en el metabolismo celular y tisular de plantas creciendo in vitro. (Scowcroft, 1981)

El ácido indolacético, AIA, la auxina más común, se suele formar cerca de los brotes nuevos, en la parte superior de la planta, y fluye hacia abajo para estimular el alargamiento de las hojas recién formadas. Los científicos han obtenido compuestos químicos, llamados estimulantes del crecimiento, basados en las auxinas naturales. (Agvik, 2011)

El ácido indolbutírico AIB se utiliza para causar la formación de raíces aún más a menudo que el ANA o cualquier otra auxina. El AIB es activo pese a que se metaboliza con rapidez a AIB -aspartato y al menos otro compuesto conjugado con un péptido. Se ha sugerido que la formación de conjugado almacena al AIB y que su liberación gradual mantiene niveles adecuados de concentración de AIB, especialmente en las etapas finales de la formación de la raíz. (Agvik, 2011)

El ácido naftalenacético, comúnmente abreviado ANA, es un compuesto orgánico con la fórmula  $C_{10}H_7CH_2CO_2H$ . ANA es una hormona vegetal de la familia de las auxinas y es un ingrediente en muchos productos comerciales para enraizamiento; es un agente enraizador y es usado en la propagación vegetativa de plantas. También es usado en el cultivo de tejidos. (Agvik, 2011)

### **G. Efectos de las auxinas sobre las raíces y su formación:**

La práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia debido a que tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las plantas *in vitro* a condiciones de invernadero. El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente el trasplante a un medio de cultivo modificado. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas. Entre los efectos auxínicos en las plantas, se encuentra la formación de raíces. (Agvik, 2011)

Como se demostró por primera vez en la década de los treinta, la administración de auxinas promueve la elongación de secciones escindidas de raíces e incluso de raíces intactas de muchas especies, pero sólo en concentraciones extremadamente bajas. Con concentraciones mayores, casi siempre se inhibe la elongación. La suposición es que las células de la raíz suelen contener auxina suficiente o casi suficiente para la elongación normal. Se cree que parte de esta inhibición se debe al etileno, ya que todos los tipos de auxinas estimulan la producción de etileno en muchas clases de células vegetales, especialmente cuando se añaden cantidades de auxina relativamente grandes. Evidencias indican que las auxinas de los tallos influyen de forma acusada en la iniciación de la raíz y estimulan el desarrollo de raíces secundarias en los tallos. En 1935, Went y Kenneth V. Thimann demostraron que el AIA estimula la iniciación de las raíces a partir de cortes de tallo. La auxina sintética ANA suele ser más eficaz que el AIA. (Agvik, 2011)

El desarrollo de raíces es el tipo de órganos más frecuente. La rizogénesis puede ser promovida por auxinas, hidratos de carbono, luz (fotoperiodo y oscuridad). Las condiciones cambian de acuerdo con la especie de la planta y en ocasiones según las variedades de una misma especie, por lo cual las variaciones en las concentraciones de auxinas son diferentes. El enraizamiento *in vitro*, se ha trabajado en diferentes especies vegetales. (Agvik, 2011)

## **H. Citocininas**

Las citocininas son compuestos de adenina sustituidos que promueven la división celular en los sistemas tisulares cultivados *in vitro*. Las citocininas que más se emplean son: KIN, BAP y ZEA. (Agvik, 2011)

## **I. Giberelinas**

Existen también giberelinas que son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis). (Agvik, 2011)

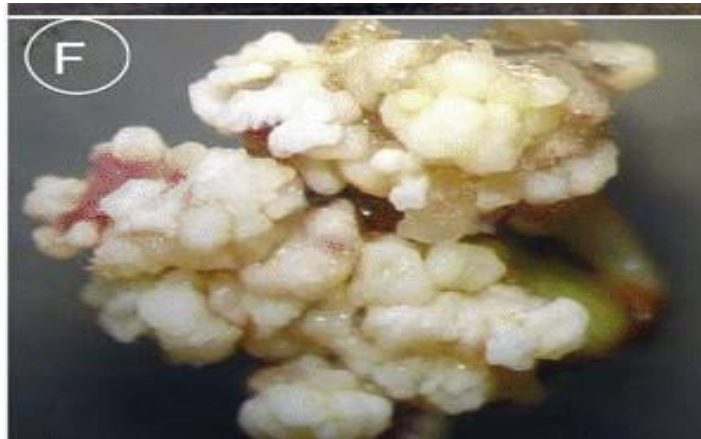
## V. ANTECEDENTES

### A. Período de inducción con auxina promotora de la regeneración de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) con explantes de disco foliar

Utilizando la variedad de caña CoC671, Franklin *et al.* (2006), demostraron que la aplicación de un pretratamiento aplicado a discos foliares, consistente en la exposición de estos al 2,4-D en una concentración de 2.4 mg/l, fue eficiente para la regeneración de plantas. En su investigación evaluó el efecto de esta exposición durante 0, 5, 8 y 10 días, encontrando que la exposición de los explantes durante 8 días resultó en mayores porcentajes de regeneración y número de plantas por explante, cuando estos fueron trasladados a un medio MS con 0.1 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de ANA. Estos resultados los comprobó en cinco variedades más, concluyendo que esta vía de regeneración es independiente del genotipo.

El cultivo continuo de los explantes en el medio de inducción da como resultado la formación de un callo embriogénico, como se muestra en la Ilustración 5. Los explantes de control sin inducción mostraron una regeneración muy baja (5%). (Franklin *et al.*, 2006)

*Ilustración 4. segmento de nervadura central cultivadas continuamente en medio de inducción con callo embriogénico.*



(Franklin *et al.*, 2006)

Los resultados del experimento de Franklin *et al.* (2006) se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Influencia del periodo de pretratamiento con 2,4-D en la regeneración de segmentos de nervadura central en la variedad CoC671 de Caña de Azúcar.

Período de pretratamiento con 2,4-D (días)	Regeneración (%)	Explantes después de varios intervalos de cultivos		
		18 días	35 días	45 días
0	5	2.0 +- 0.3 a	6.0 +- 1.2 a	9.0 +- 2.3 a
5	30	2.8 +- 0.5 a	6.5 +- 1.6 ab	11.0 +- 2.8 ab
8	90	4.6+-1.2 b	10.9 +- 2.8 b	16.3 +- 3.3 b
10	15	2.3 +- 0.5 a	5.5 +- 1.5 a	7.8 +- 2.9 a

Los valores (media  $\pm$  DE) en una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ),  $n = 20$

(Franklin *et al.*, 2006)

De los resultados de este estudio, está claro que el período de inducción con 2,4-D jugó un papel importante en la regeneración de la planta. El aumento gradual en el porcentaje de regeneración con el aumento del período de inducción muestra que el número de células potencialmente morfogénicas había aumentado de una manera dependiente del tiempo durante el periodo de inducción. Dado que el cultivo continuo de explantes sobre el medio de inducción dio lugar a la formación de callos embriogénicos, también está claro que una vez que se había inducido la competencia morfogénica, la auxina promueve la embriogénesis e inhibe el desarrollo de los brotes. Se reportaron que los explantes dieron lugar a la proliferación de callo continua sin regeneración cuando se mantiene en un medio con 2,4-D. El bajo potencial de regeneración de los explantes en un medio que contiene BAP sin medio de inducción sugiere que BAP no tuvo ningún papel en la fase anterior de regeneración. Después de 10 días con medio de inducción, los explantes produjeron callos en alta frecuencia en medio fortificado con BAP, lo que indica que pierden su facilidad hacia BAP después del período óptimo. Por lo tanto, para la regeneración directa eficiente, el período de inducción y el momento de aplicación de BAP es crucial. (Franklin *et al.*, 2006)

## VI. MARCO METODOLÓGICO

### A. Características:

1. Tratamientos (dosis de 2,4-D: 0, 2, 3, 4 y 5 mg/l durante 8 días en el medio de inducción).
2. Medio de cultivo: MS (Murashige y Skoog).
3. Dos fases: (1) inducción con diferentes dosis de 2,4-D en oscuridad, (2) regeneración de plantas con luz a 25 °C.
4. Duración: Ocho días (fase 1), 60 días (fase 2)
5. Tres experimentos independientes;
  - a. Experimento 1: Variedad CP73-1547, diseño completamente al azar, 5 tratamientos, con 5 repeticiones. El medio de regeneración utilizado fue  $\frac{1}{2}$  de MS + 6% de sacarosa + 0.1 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA + 0.2 % de Phytigel.
  - b. Experimento 2: Diseño de parcelas divididas con 2 factores; factor 1: variedad (CP73-1547 y CP72-2086), factor 2: dosis de 2,4-D en el medio de inducción con 4 repeticiones. El medio de regeneración utilizado fue  $\frac{1}{2}$  de MS + 6% de sacarosa + 0.1 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA + 0.2 % de Phytigel.
  - c. Experimento 3: Diseño de parcelas divididas con 2 factores; factor 1: variedad (CP73-1547 y CP72-2086), factor 2: dosis de 2,4-D en el medio de inducción con 3 repeticiones. El medio de regeneración utilizado fue MS + 3% de sacarosa + 0.2 % de Phytigel.

### B. Variedades a utilizar:

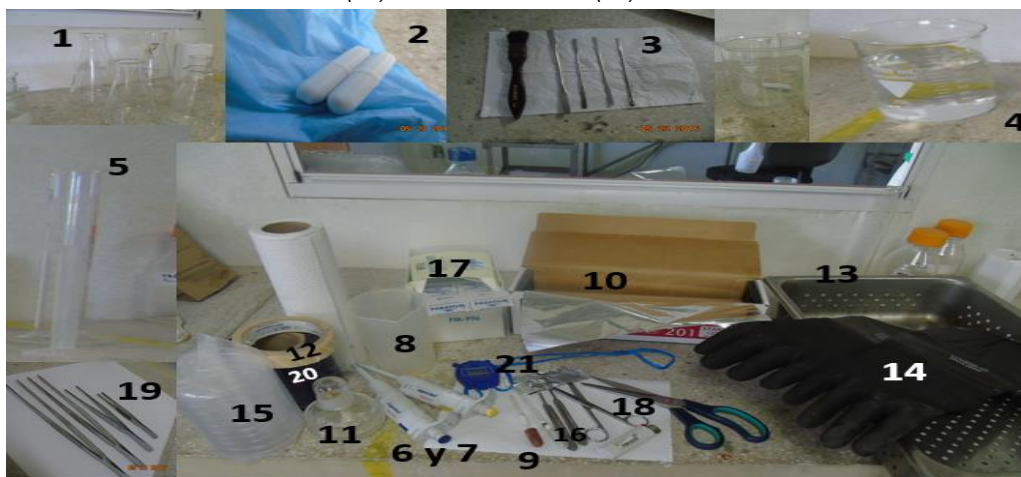
En este trabajo se evaluó la respuesta de dos variedades de caña de azúcar, CP72-2086 y CP73-1547. Aguirre (2006) describe la siguiente información sobre estas variedades:

- |  |   |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. CP 72-2086<ol style="list-style-type: none"><li>a. CP Canal Point (Florida)</li><li>b. 72 Año de selección</li><li>c. 2086 Número correlativo de selección</li><li>d. Progenitores CP 62-374 X CP63-588</li></ol></li></ol> | <ol style="list-style-type: none"><li>2. CP 73-1547<ol style="list-style-type: none"><li>e. CP Canal Point (Florida)</li><li>f. 73 año de selección</li><li>g. 1547 Número correlativo de selección</li><li>h. Progenitores CP 66-1043 * CP 56-63</li></ol></li></ol> |
|--|---|

### C. Materiales o instrumentos:

A continuación, se muestran los materiales o instrumentos que ayudaron a la realización de los tres experimentos descritos anteriormente, siendo estos de gran importancia para su elaboración

*Ilustración 5. Instrumentos de trabajo utilizados. (1) Erlenmeyer de 200 ml (2) Agitadores magnéticos. (3) Espátulas pequeñas. (4) Beaker de 200 ml y 1000 ml (5) Probeta de 100 ml y 1000 ml (6) Pipeta de 5 ml (7) Pipeta de 1 ml (8) Pichel de 1 l (9) 2 Goteros. (10) Papel aluminio. (11) Mechero de alcohol. (12) Tape especial para autoclave. (13) Bandeja de metal. (14) Guantes de neopreno. (15) Cajas Petri estériles. (16) Bisturí. (17) Parafilm. (18) Tijera. (19) Pinzas. (20) Plástico adhesivo. (21) Cronómetro.*



### D. Equipo:

A continuación, se muestra todo el equipo que se utilizó durante la realización de los tres experimentos.

*Ilustración 6. Equipo utilizado. (A) Balanza. (B) Potenciómetro. (C) Plancha agitadora. (D) Incubadora. (E) Cámara de flujo laminar. (F) Refrigerador. (G) Autoclave.*



## E. Preparación de soluciones concentradas para elaborar medio de cultivo:

Cuadro 2. Preparación de 1 l de solución concentrada de macroelementos

No.	Ingrediente	Cantidad
1	Nitrato de Amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	16.5 g
2	Nitrato de Potasio ( $\text{KNO}_3$ )	19 g
3	Cloruro de Calcio Hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	4.40 g
4	Magnesio de sulfato Heptahidrato ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3.70 g
5	Fosfato de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.70 g

Colocar 200 ml de agua desmineralizada en un beaker de 1000 ml, agregar los reactivos y agitar hasta que todos se diluya, luego trasvasar a un balón de aforación y aforar con agua desmineralizada hasta llegar al volumen de 1000 ml

Cuadro 3. Preparación de 1 l de solución concentrada de microelementos 100X

No.	Ingrediente	Cantidad
1	Yoduro de potasio (KI)	0.083 g
2	Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.620 g
3	Sulfato de Magnesio ( $\text{MnSO}_4$ )	1.280 g
4	Sulfato de Zinc Heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.860 g
5	Di hidrato de molibdato sódico ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.025 g
6	Sulfato de Cobre Pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.0025 g
7	Cobalto cholidrico hidratado $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025 g

Colocar 200 ml de agua desmineralizada en un beaker de 1000 ml, agregar los reactivos y agitar hasta que todos se diluyan, luego trasvasar a un balón de aforación y aforar con agua desmineralizada hasta llegar al volumen de 1000 ml.

Cuadro 4. Preparación de soluciones concentradas de hierro, vitaminas y sulfato de cobre.

<b>FE/EDTA 50X 1 l. de solución</b>		
No.	Ingrediente	Cantidad
1	EDTA	1.86 g
2	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.30 g
Disolver los ingredientes en un litro de agua desmineralizada		
<b>Vitaminas 100X 1 l. de solución</b>		
1	Tiamina	0.1 g
2	Pyrodoxol-HCL	0.05 g
3	Ácido Nicotínico	0.05 g
Disolver los ingredientes en un litro de agua desmineralizada		
<b>Sulfato de Cobre (<math>\text{CuSO}_4</math>) 50 mM (100 ml de solución)</b>		
1	Disolver 1.25 g en 100 ml de agua desmineralizada	

Cuadro 5. Preparación de soluciones concentradas de BAP, ANA y 2,4-D.

<b>BAP 0.3 mg./ml.</b>
Disolver 0.03 g en 5 ml de KOH 0.5 M y aforar a 100 ml de agua
<b>ANA 0.1 mg/ml</b>
Disolver 0.01 g en 5 ml de KOH 0.5 M y aforar a 100 ml de agua
<b>2,4-D 0.5 mg/ml</b>
Disolver 0.050 g en 5 ml de etanol y aforar a 100 ml de agua

## F. Preparación de medio de inducción:

Cuadro 6. Cantidad de ingredientes a utilizar en la preparación de diferentes volúmenes de medio de inducción (Fase 1).

Volumen a preparar	2000 ml	1000 ml	500 ml
<b>Ingredientes sólidos</b>			
Sacarosa	60 g	30 g	15 g
Myo-inositol C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.4 g	0.2 g	0.1 g
PVP (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) <sub>n</sub>	1 g	0.5 g	0.25 g
Caseína hidrolizada	2 g	0.5 g	0.25 g
Phytigel (Gelificante)	4 g	2 g	1 g
<b>Ingredientes líquidos</b>			
Macro elementos 10X	200 ml	100 ml	50 ml
Miro elementos 100X	20 ml	10 ml	5 ml
Vitaminas 100X	20 ml	10 ml	5 ml
Sulfato de Cobre (CuSO <sub>4</sub> ) 50mM.	2 ml	1 ml	0.5 ml
Fe/EDTA 50X	40 ml	20 ml	10 ml

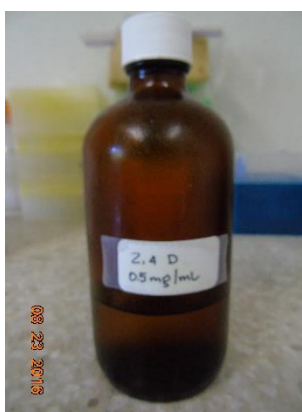
Ilustración 7. Sales minerales(A) Ingredientes sólidos. (B) Ingredientes líquidos.



Cuadro 7. Volúmenes de solución de 2,4-D que se debe agregar a 200 ml de medio de inducción de acuerdo con los tratamientos para la fase 1.

Tratamiento	Concentración final (mg/l)	Volumen (ml)
Control (1)	0	0
2	2	0.8
3	3	1.2
4	4	1.6
5	5	2

Ilustración 8. Solución de 2,4-D con una concentración de 0.5 mg/ml.



Cuadro 8. Cantidad de ingredientes a utilizar en la preparación de diferentes volúmenes de medio MS de regeneración (Fase 2).

Volumen a preparar	2000 ml	1000 ml	500 ml
<b>Sólidos</b>			
Sacarosa	120 g	60 g	30 g
Myo-inositol C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.2 g	0.1 g	0.05 g
PVP (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) n	0.5g	0.25 g	0.125 g
Caseína Hidrolizada	0.5g	0.25 g	0.125 g
Phytigel (Gelificante)	4 g	2 g	1 g
<b>Líquidos</b>			
Macro elementos	100 ml	50 ml	25 ml
Miro elementos	10 ml	5 ml	2.5 ml
Vitaminas	10 ml	5 ml	2.5 ml
Sulfato de Cobre (CuSO <sub>4</sub> )	1 ml	0.5 ml	0.25 ml
Fe/EDTA (hierro)	20 ml	10 ml	5 ml
BAP [0.3 mg/ml]	0.20 ml	0.10 ml	0.5 ml
Ácido Naftalénico (ANA) [0.1 mg/ml]	0.20 ml	0.10 ml	0.5 ml

### G. Procedimiento para preparar medio de inducción (fase 1):

1. En un beaker de 1000 ml se agregaron 200 ml de agua desmineralizada, se mezcló los ingredientes descritos en el Cuadro 7 para un volumen de 1000 ml, luego en una probeta se mide el volumen y se afora a 1000 ml con agua desmineralizada.
2. Se dividió la solución anterior en 5 beakers conteniendo cada uno 200 ml a los cuales se les agrega el 2,4-D de acuerdo con el Cuadro 8.
3. Se ajustó el pH a 5.7 - 5.8.
4. Se trasladaron las soluciones de los beaker a Erlenmeyer de 200 ml. y agregaron 0.4 g de Phytigel a cada uno. Se tapó los Erlenmeyer con papel aluminio y esterilizó en autoclave por 20 minutos, 18 psi a 120 °C.
5. Luego de esterilizar el medio, se dejó bajar la temperatura hasta aproximadamente 60°C. dentro de la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol etílico al 70% y se procedió a servir en las cajas Petri, vertiendo aproximadamente 30 ml por caja y se deja solidificar.
6. Se identificaron las cajas Petri de acuerdo a su concentración de 2,4-D y se envolvieron en plástico adhesivo, luego se colocan dentro de bolsas plásticas y se almacenan en el refrigerador a 4°C.

*Ilustración 9. Procedimiento: (A) Mezcla de sales minerales. (B) Separación de 1l en beaker de 200 ml (C) Medición y colocación de diferentes dosis de 2,4-D. (D) Medición de pH (E) Traslado de solución de beaker a Erlenmeyer y autoclaveado durante 20 minutos. (F) Preparación de cajas Petri en cámara de flujo laminar, para servir el medio. (G) Etiquetado de tratamientos.*



### H. Procedimiento para la siembra de discos foliares (fase 1)

1. Primero se procedió a separar el cogollo del resto del tallo, luego se quitaron todas las hojas y se lavó con agua y con jabón, posteriormente se colocó los cogollos en

probetas, las cuales se llenan con cloro al 2.5% y se dejaron en esta solución durante 25 minutos, se recomienda si son distintas variedades se etiquete la probeta con la variedad que se introducirá en ella.

2. Se enciende la cámara de flujo y se desinfecta con alcohol al 70%, seguido de esto, se vertió alcohol al 95 % en un mechero para flamear los instrumentos y en un beaker o frasco estéril de 250 ml que se usa para sumergir las pinzas y bisturís cuando se flamean, luego se preparó pinzas y bisturís, así como cajas Petri y el papel mayordomo previamente esterilizado.
3. Se introdujo a la cámara de flujo las cajas Petri con el medio de diferentes concentraciones de 2, 4-D y se retiraron las tapaderas durante 25 minutos para secar el excedente de agua que puedan tener, si esta no se evapora rápido se puede introducir una hoja de papel mayordomo esterilizada y sacudir la tapadera para secarla, se tapa y se coloca alineada para su utilización.
4. Se retiró el cloro de la probeta que contiene los cogollos y se realizaron tres lavados con agua desmineralizada para eliminar el exceso de cloro.
5. Posteriormente sobre una toalla de papel mayordomo esterilizada se colocaron las cajas Petri, con un bisturí y una pinza.
6. Se tomó el cogollo y se retiraron 2 o 3 hojas más del cogollo y posteriormente con la ayuda de una pinza se sujetó el cogollo y se realizó un corte transversal a manera que quepa dentro de la caja Petri esterilizada.
7. Sin soltar el cogollo y utilizando el segundo bisturí con mucho cuidado se seleccionó el cogollo en secciones de aproximadamente 0.5 cm.
8. Se procedió a tomar dos pinzas (pequeñas) para realizar la separación de segmentos foliares de cada disco. De esta forma, todos los segmentos obtenidos de un mismo disco foliar quedaron sembrados en una caja Petri con un determinado tratamiento en el medio de inducción.
9. Por último, la caja, se cerró y rotuló con el nombre de la variedad y la concentración de 2,4-D correspondiente, juntamente con la fecha que está siendo sembrada.
10. Cuando se terminó de sembrar el primer disco se flameó las pinzas, se tomó de nuevo el cogollo y con el segundo bisturí se procedió a cortar el siguiente disco.

*Ilustración 10. Procedimiento de siembra en medio de inducción. (A) Preparación de cajas Petri con medio de inducción y vástagos desinfectados con cloro al 2.5%. (B) Desprendimiento de 2 a 3 hojas del vástago. (C) Flameado de bisturí y de pinzas. (D) Corte de disco con ayuda de herramientas. (E) Vista de explantes de un disco foliar. (F) Sellado de caja Petri con parafilm.*



### **I. Procedimiento para preparar medio ms de regeneración (fase 2)**

1. En un beaker de 2000 ml se agregaron 400 ml de agua desmineralizada, se mezclaron los ingredientes del Cuadro 9, luego en una probeta se midió el volumen y se aforó a 2000 ml con agua desmineralizada.
2. Se midió el pH a 5.7 -5.8.
3. Se vertió el medio en dos Erlenmeyer, 1000 ml en cada uno y se les agregó la cantidad correspondiente de Phytigel (2 g a cada uno).
4. Se taparon ambos Erlenmeyer con papel aluminio y se llevaron a ebullición en autoclave por 5 minutos, 18 psi a 120 °C. Luego, se sacaron los Erlenmeyer con guantes de neopreno para evitar quemaduras.
5. Con la ayuda de un pichel y una probeta se midió 40 ml y se le agregó a cada frasco, posteriormente se taparon con papel aluminio y se esterilizaron por 20 minutos en autoclave a 18 psi y 120°C.
6. Por último, se procedió a sacar los frascos cuando el autoclave estuviera frío, y se dejaron a temperatura ambiente para que solidificaran. Finalmente se almacenaron en refrigerador a 4°C.

El medio de regeneración descrito arriba se utilizó en los experimentos 1 y 2, mientras que el medio de regeneración utilizado en el experimento 3 se preparó simplemente mezclando los ingredientes del Cuadro 7.

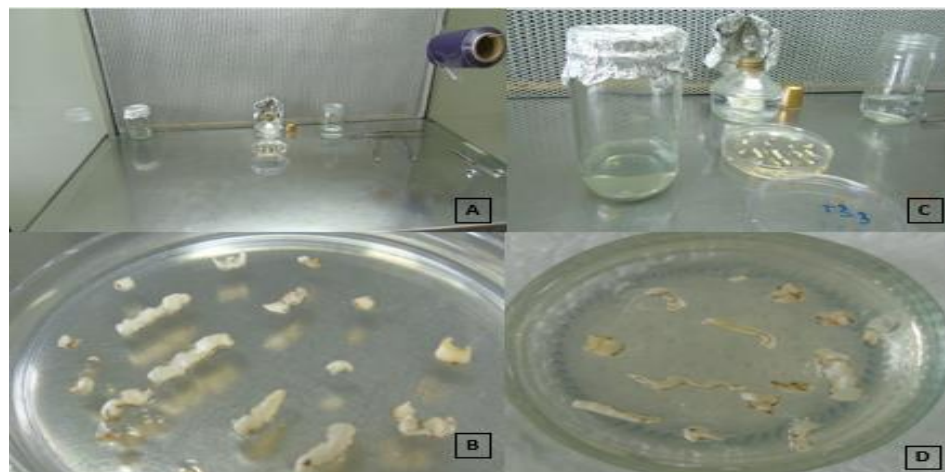
*Ilustración 11. Procedimiento para preparar medio MS de regeneración. (A) Mezcla de sales minerales. (B) Medición de pH (C) Colocación del medio en autoclave durante 5 minutos, posteriormente se traslada a frascos y se coloca en autoclave durante 15 minutos más. (E) Almacenamiento de frascos con medio de regeneración.*



#### **J. Procedimiento para la siembra de explantes en el medio de regeneración**

1. Se procedió a encender la cámara de flujo y se desinfectó con alcohol al 70%, seguido se prendió el mechero y vertió alcohol al 96% en un beaker o un frasco estéril de 250 ml y se preparó pinzas. Se sacó el medio de regeneración del refrigerador y se introdujo los frascos previamente limpiados con ayuda de papel mayordomo y alcohol etílico al 70%, se dejó aclimatar durante 15-20 minutos antes de su utilización.
2. Se tomó una caja de Petri con los explantes que provienen de la fase 1, con cuidado se le retiró el parafilm, luego se tomó uno de los frascos con medio de regeneración y se quitó el papel aluminio.
3. Con pinzas previamente esterilizadas se procedió a trasladar las venas y las hojas y acomodarlas en el medio de regeneración, luego se tapó con plástico adhesivo y se rotuló por tratamiento, variedad y fecha de siembra.
4. Las pinzas se flamearon antes de repetir el procedimiento.
5. Se recomienda que no se demore el cambio para evitar contaminaciones.
6. Se guardaron los frascos en incubadora a 25 °C con 16 horas luz durante 60 días.

Ilustración 12. Siembra de explantes al medio de inducción a medio de regeneración. (A) Preparación de cámara de flujo. (B) Visualización de hojas y venas foliares en medio de inducción. (C) Traslado de hojas y venas a medio de regeneración. (D) Visualización de hojas y venas foliares en medio de regeneración.



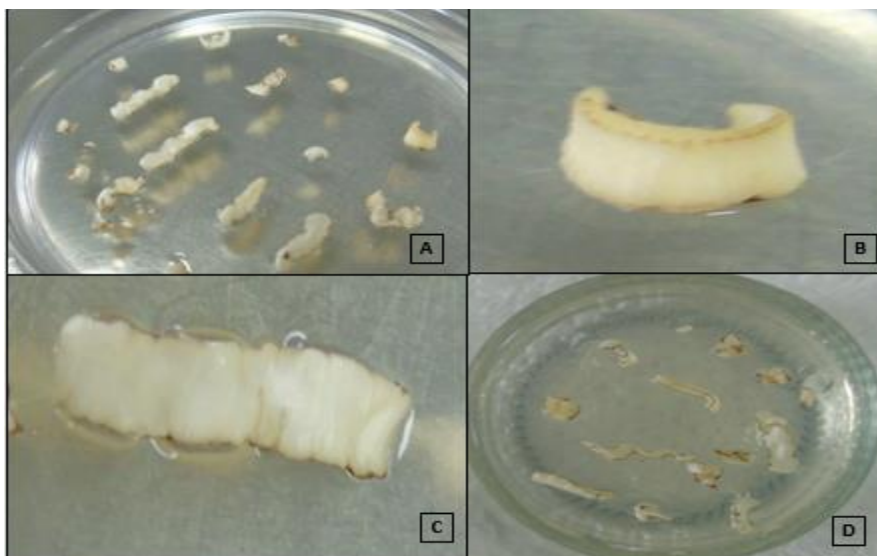
Luego de 60 días de incubación, se registró el porcentaje de explantes que regeneraron plantas y el número de plantas regeneradas por explante en cada una de las variedades. Los datos se tabularon y analizaron mediante análisis de varianza. Todos los datos se transformaron a  $\log_{10}$  para su análisis. Para la separación de medias en las variables que mostraron diferencias significativas se utilizó la prueba de Duncan con 5 % de significancia. Se utilizó el programa InfoStat (Rienzo J.A. *et al.*, 2016) para el análisis estadístico de los datos.

## VII. RESULTADOS

### A. Fase 1 (Inducción)

Luego de exponer los explantes durante 8 días en un medio de inducción con diferentes dosis de 2,4-D, no se observaron diferencias morfológicas en su apariencia en ninguno de los experimentos, como se muestra en la Ilustración 15.

*Ilustración 13. Fase 1 después de 8 días en tratamiento de inducción con 2,4-D (A) Explantes separados de un disco foliar provenientes del vástago de caña de azúcar. (B) Vena foliar. (C) Lámina foliar. (D) explantes trasladados a medio de regeneración.*

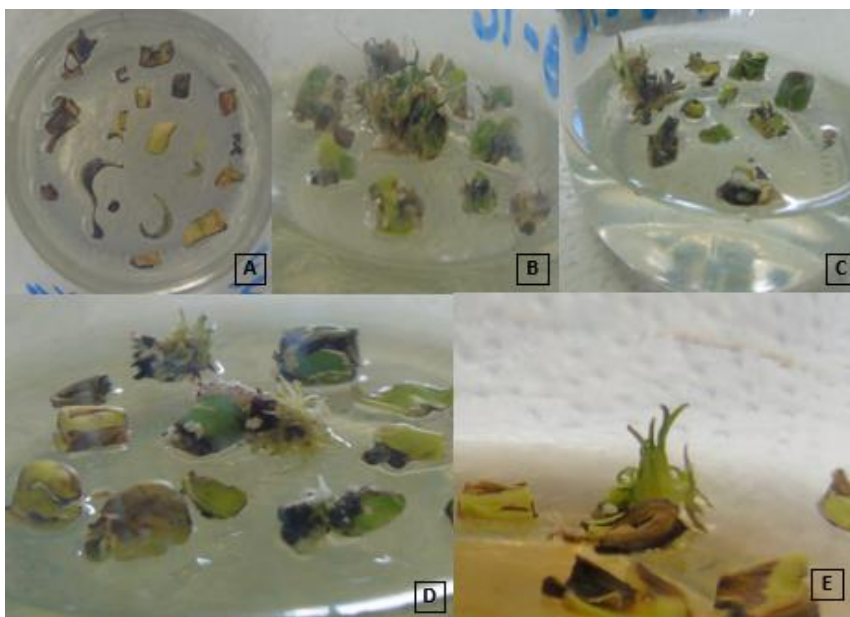


### B. Fase 2 (Regeneración)

**1. Experimento 1:** Variedad CP73-1547, medio de regeneración de  $\frac{1}{2}$  de MS + 6% de sacarosa + 0.1 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA + 0.2 % de Phytigel.

**a. Porcentaje de regeneración:** La Ilustración 16 nos muestra la reacción de los explantes luego de 60 días en el medio de regeneración, de acuerdo con 4 dosis de 2,4-D empleadas en el medio de inducción

Ilustración 14. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 3 mg/l (D) 4 mg/l (E) 5 mg/l Variedad CP72-1547, experimento 1.

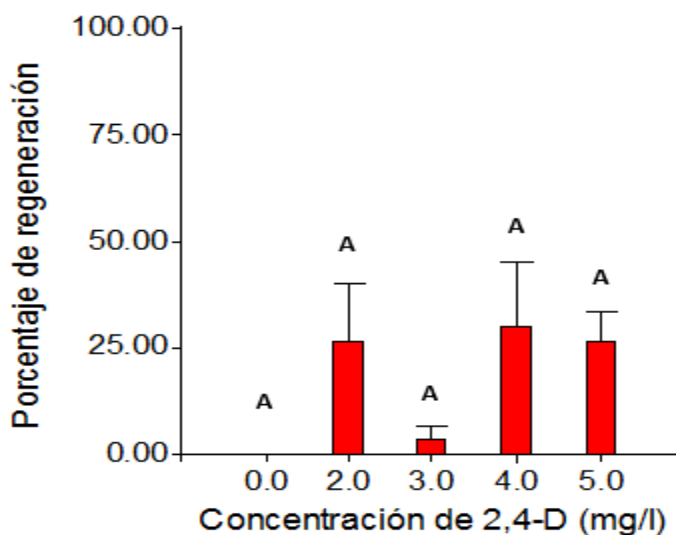


El registro de la respuesta de los explantes, medido como porcentaje de regeneración para cada dosis evaluada, se sometió a un análisis de varianza. Los resultados no mostraron que existan diferencias significativas entre los tratamientos como se aprecia en el Cuadro 10. El rango de variación estuvo entre 0 % para el control sin 2,4-D en la inducción, hasta 30 % para las dosis de 2 y 4 mg/l (Gráfica 1).

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable porcentaje de regeneración (datos transformados a  $\log_{10}$ ), variedad CP73-1547, experimento 1.

	N			CV	
	15			0.72	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.70E-04	4	9.20E-05	1.74	0.2173
Tratamiento	3.70E-04	4	9.20E-05	1.74	0.2173
Error	5.30E-04	10	5.30E-05		
Total	9.00E-04	14			

Gráfica 1. Porcentaje de regeneración de los explantes de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento 1

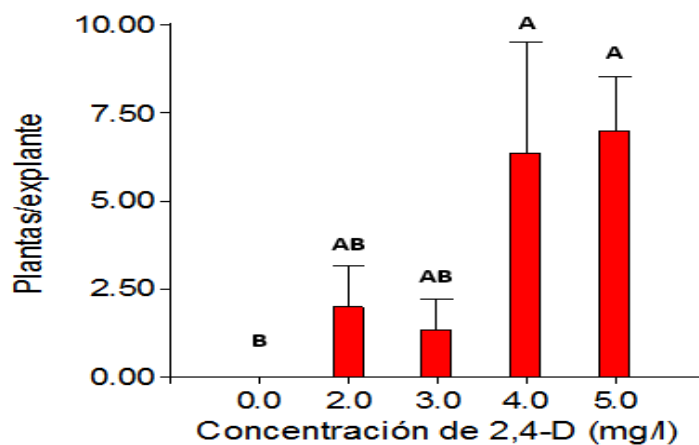


**b. Plantas regeneradas por explante:** El número de plantas regeneradas por explante, a los 60 días después de la siembra en el medio de regeneración, también se registró para cada una de las dosis de 2,4-D evaluadas. Los resultados obtenidos en el análisis de varianza se muestran en el Cuadro 11. El número de plantas regeneradas varió entre 0 para el tratamiento sin 2,4-D (control) y 7 plantas por explante para la dosis de 5 mg/l (Gráfica 2).

Cuadro 10. Análisis de varianza para la variable plantas regeneradas por explante (datos transformados a  $\log_{10}$ ), variedad CP73-1547, experimento 1.

N		CV			
15		8.24			
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.11	4	0.03	3.34	0.0554
Tratamiento	0.11	4	0.03	3.34	0.0554
Error	0.08	10	0.01		
Total	0.2	14			

Gráfica 2. Plantas regeneradas por explante de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento 1.



**2. Experimento 2:** variedades; CP73-1547 y CP72-2086. El medio de regeneración utilizado fue  $\frac{1}{2}$  de MS + 6% de sacarosa + 0.1 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA + 0.2 % de Phytigel.

**a. Porcentaje de regeneración:** Las ilustraciones 17 y 18 nos muestran la reacción de los explantes luego de 60 días en el medio de regeneración, de acuerdo con las dosis de 2,4-D empleadas en el medio de inducción. Puede observarse que hubo regeneración en todas las dosis y variedades evaluadas.

Ilustración 15. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 4 mg/l (D) 5 mg/l Variedad CP72-1547, experimento 2.

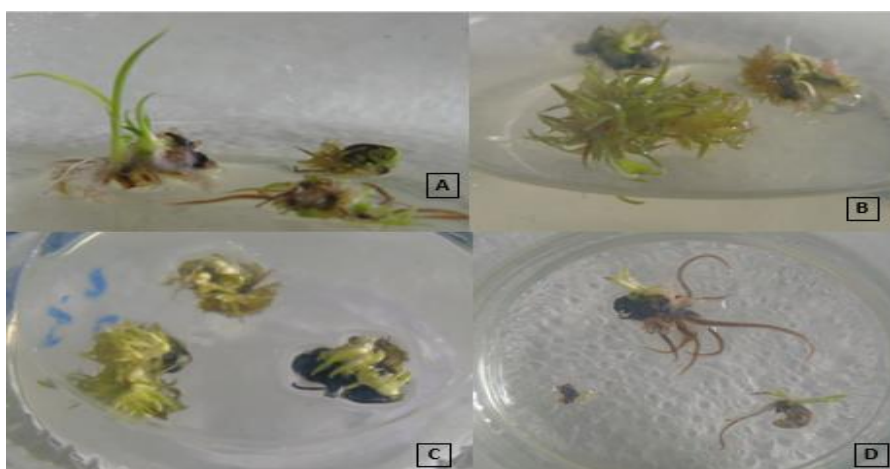
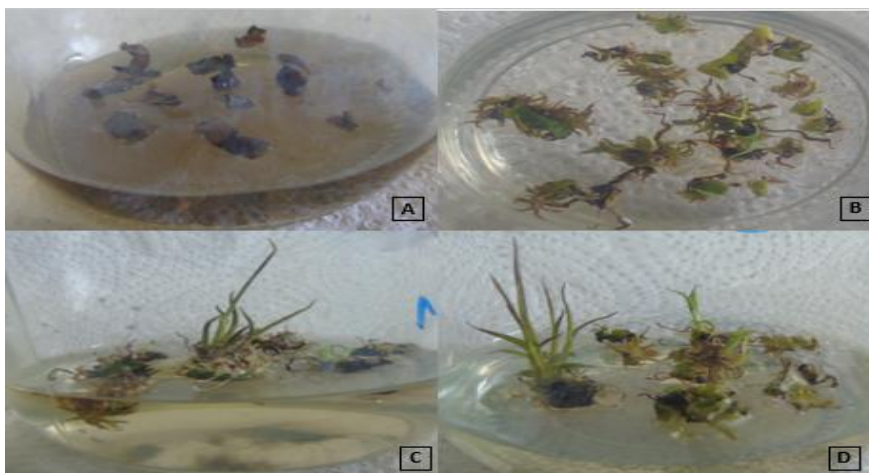


Ilustración 16. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 4 mg/l (D) 5 mg/l Variedad CP73-2086, experimento 2.



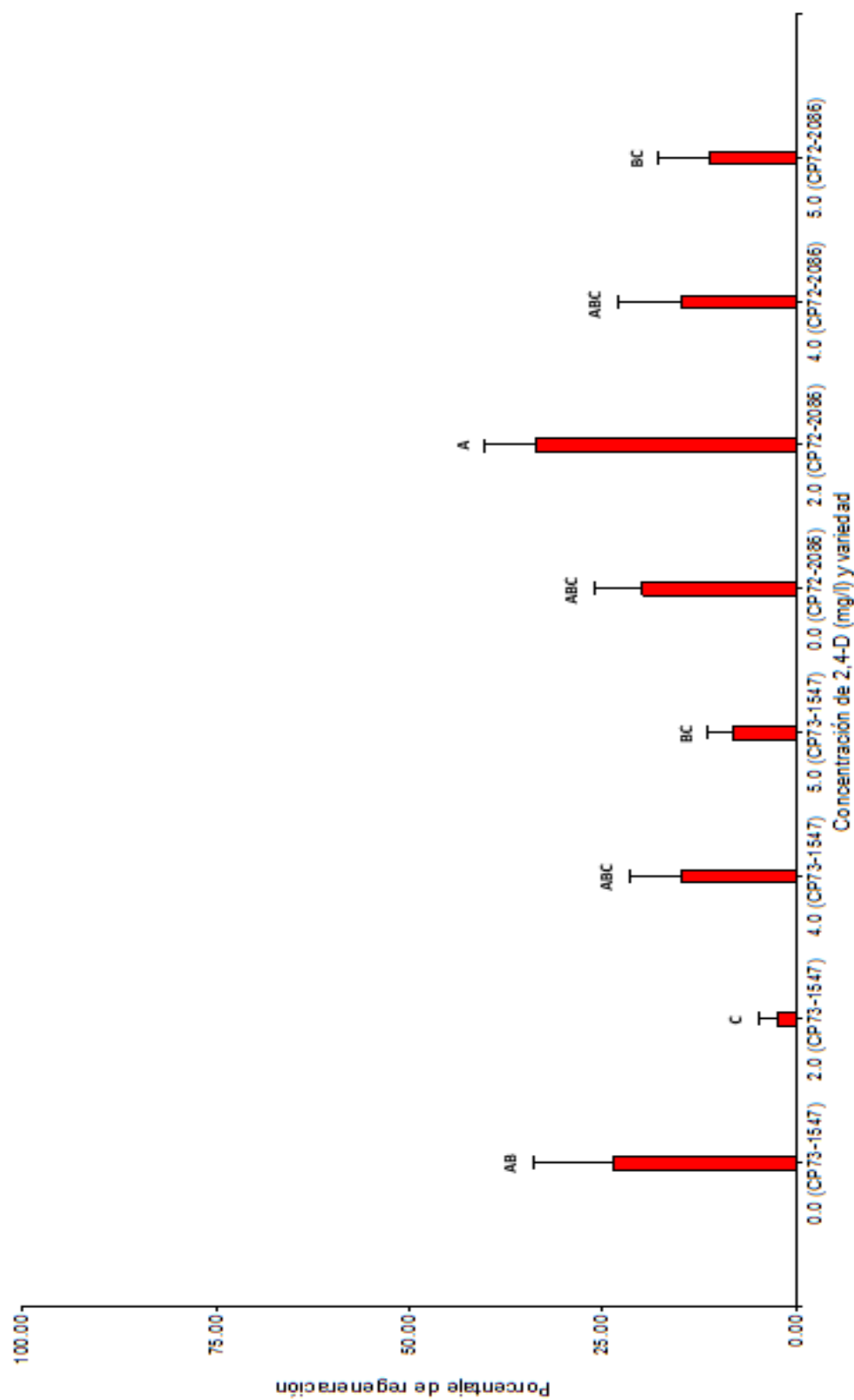
El registro de la respuesta de los explantes, medido como porcentaje de regeneración para cada dosis evaluada, se sometió a un análisis de varianza. Los resultados no mostraron que existan diferencias significativas para los factores evaluados, pero sí para la interacción de los factores, como se aprecia en el Cuadro 12.

Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	7.80E-04	13	6.00E-05	2.4	0.0431	
Repetición	2.80E-04	3	9.30E-05	3.72	0.0306	
Variedad	8.40E-05	1	8.40E-05	10.01	0.0507	(Var*Repe)
Variedad*Repetición	2.50E-05	3	8.40E-06	0.34	0.7985	
Tratamiento	1.10E-04	3	3.80E-05	1.51	0.2452	
Tratamiento*Variedad	2.80E-04	3	9.30E-05	3.72	0.0306	
Error	4.50E-04	18	2.50E-05			
Total	1.20E-03	31				

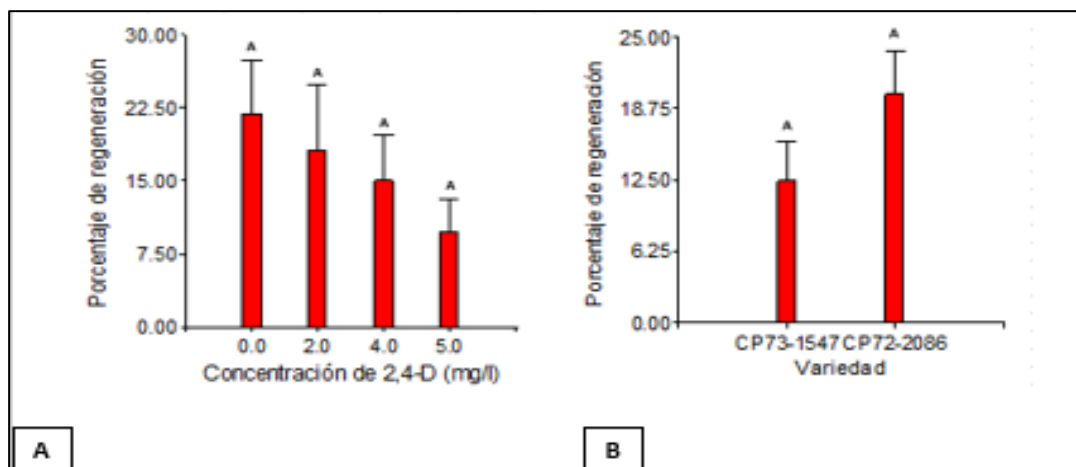
En la Gráfica 3 se muestran los porcentajes de regeneración obtenidos para la interacción de dosis de 2,4-D y variedad. Puede observarse que la dosis de 2 mg/l durante 8 días en la fase de inducción mostró la mayor respuesta en la variedad CP72-2086 (33.75 %) y la menor respuesta en la variedad CP73-1547 (2.5 %).

Gráfica 3. Porcentaje de regeneración de los explantes de la interacción tratamiento por variedad de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2.



Los resultados de porcentaje de regeneración a los 60 días después de la siembra para los factores individuales mostraron un rango entre 9.79 % para la dosis de 5 mg/l hasta 21.88 % para el control sin 2,4-D como lo muestra la gráfica 4 (A). Por otra parte, el rango de respuesta de las variedades varió de 12.4 % en la variedad CP73-1547 a 20.0 % en la variedad CP72-2086 como se muestra en la Gráfica 4 (B).

Gráfica 3. Resultados. (A) Porcentaje de regeneración de los explantes de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento 2. (B) Medias de tratamientos de la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2.



**b. Plantas regeneradas por explante:** El registro de la respuesta de los explantes, medido como el número de plantas regeneradas por explante, para cada variedad y dosis evaluada, se sometió a un análisis de varianza. Los resultados mostraron que existen diferencias significativas entre las variedades y su interacción con las dosis de 2,4-D como se aprecia en el Cuadro 13

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable plantas por explante, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2.

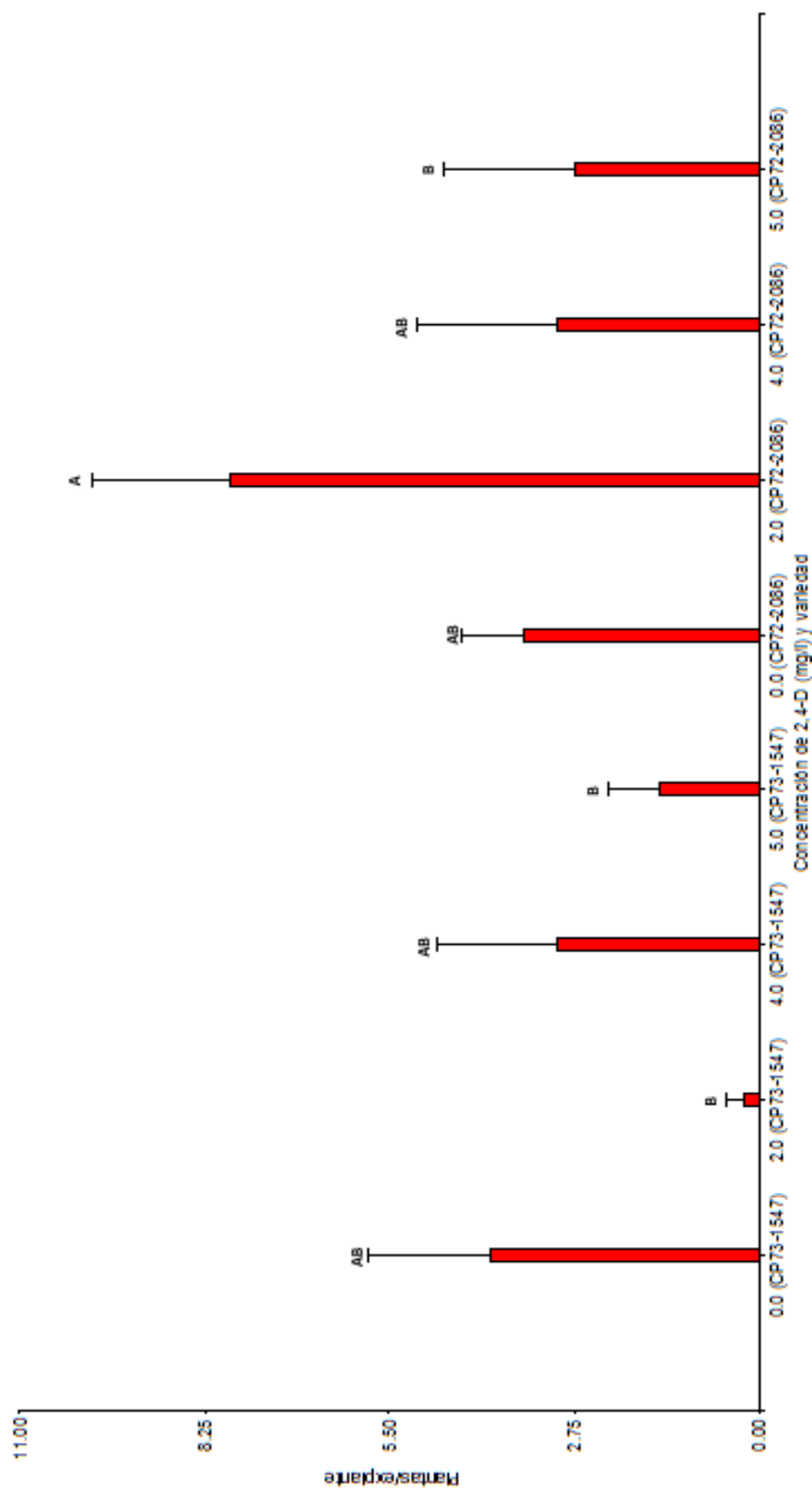
N CV						
32 8.1						
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	0.2	13	0.02	1.92	0.0998	
Repetición	0.07	3	0.02	2.73	0.0745	
Variedad	0.03	1	0.03	12.77	0.0375	(Var*Repe)
Variedad*Repetición	0.01	3	2.60E-03	0.32	0.8118	
Tratamiento	0.02	3	0.01	0.67	0.5831	

Continuación Cuadro 12

Tratamiento*Variedad	0.08	3	0.03	3.24	0.0465
Error	0.15	18	0.01		
Total	0.35	31			

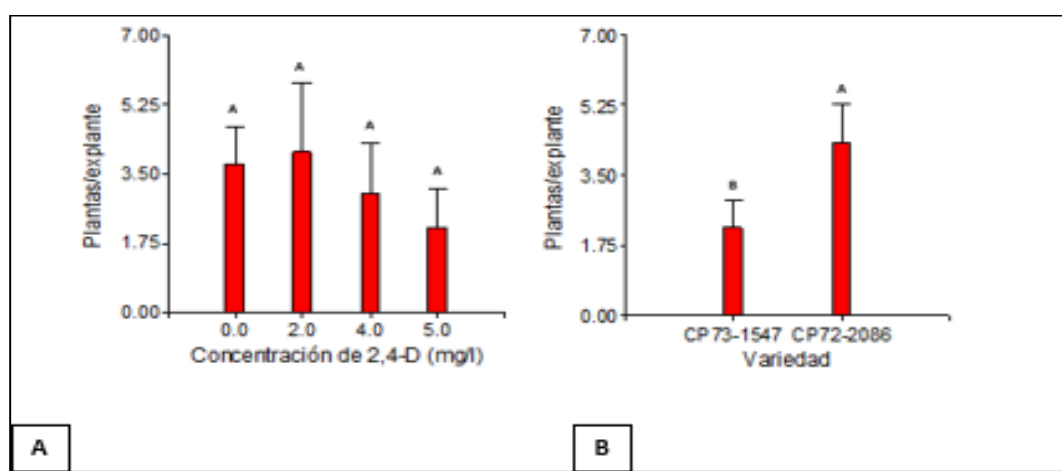
En la Gráfica 5 se muestra el número de plantas regeneradas por explante obtenidos para la interacción de dosis de 2,4-D y variedad. Puede observarse que la dosis de 2 mg/l durante 8 días en la fase de inducción mostró la mayor respuesta en la variedad CP72-2086 (7.88) y la menor respuesta en la variedad CP73-1547 (0.25).

Gráfica 5. Plantas regeneradas por explante de la interacción tratamiento por variedad de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2.



En este experimento se puede apreciar que dentro de los tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D en la fase de inducción, la variable plantas regeneradas por explante, no muestra diferencias significativas entre las medias de los tratamientos evaluados que variaron entre 4.06 y 2.13 para las concentraciones de 2 y 5 mg/l, respectivamente, al finalizar la fase de 60 días (fase de regeneración) como lo muestra la gráfica 6 (A). Por otra parte, la respuesta de las variedades si tuvo diferencias significativas con un rango de variación entre 4.8 en la variedad CP72-2086 a 2.16 en la variedad CP73-1547 como se muestra en la Gráfica 6 (B).

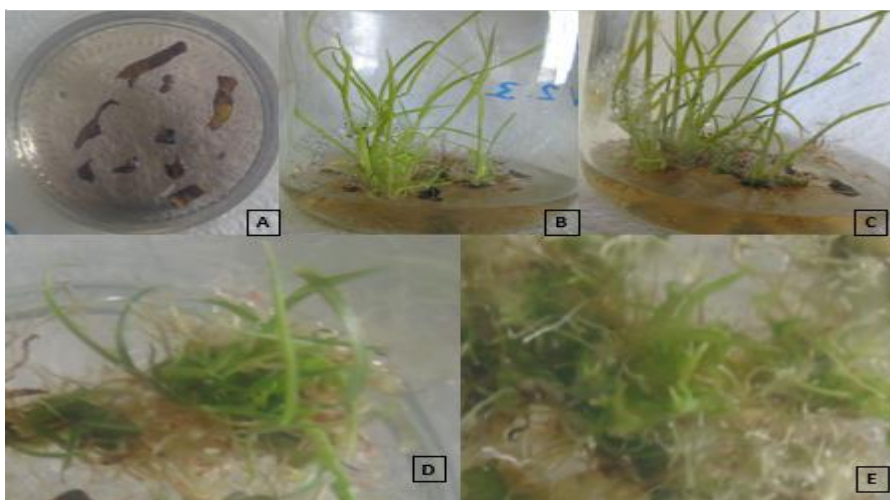
Gráfica 4. Resultados. (A) Plantas regeneradas por explante, de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento 2. (B) Medias de tratamientos de la variable plantas regeneradas por explante, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 2.



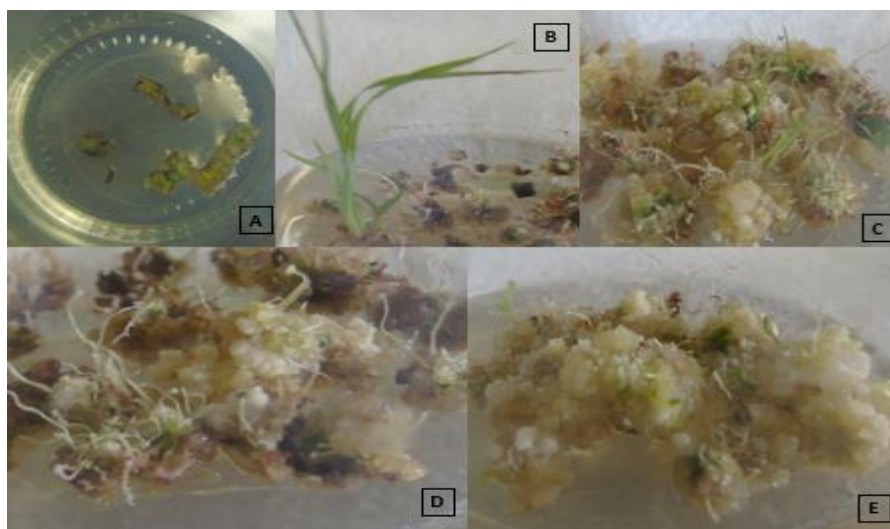
**1. Experimento 3:** Variedades; CP73-1547 y CP72-2086, el medio de regeneración utilizado fue MS + 3% de sacarosa + 0.2 % de Phytigel.

**a. Porcentaje de regeneración:** Las ilustraciones 19 y 20 nos muestran la reacción de los explantes luego de 60 días en el medio de regeneración, de acuerdo con las dosis de 2,4-D empleadas en el medio de inducción en cada una de las variedades.

*Ilustración 17. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 3 mg/l (D) 4 mg/l (E) 5 mg/l Variedad CP72-1547, experimento 3.*



*Ilustración 18. Respuesta a la regeneración de plantas, de acuerdo con las dosis de 2,4-D aplicadas en la fase de inducción. (A) control (0 mg/l) (B) 2 mg/l (C) 3 mg/l (D) 4 mg/l (E) 5 mg/l Variedad CP73-2086, experimento 3.*



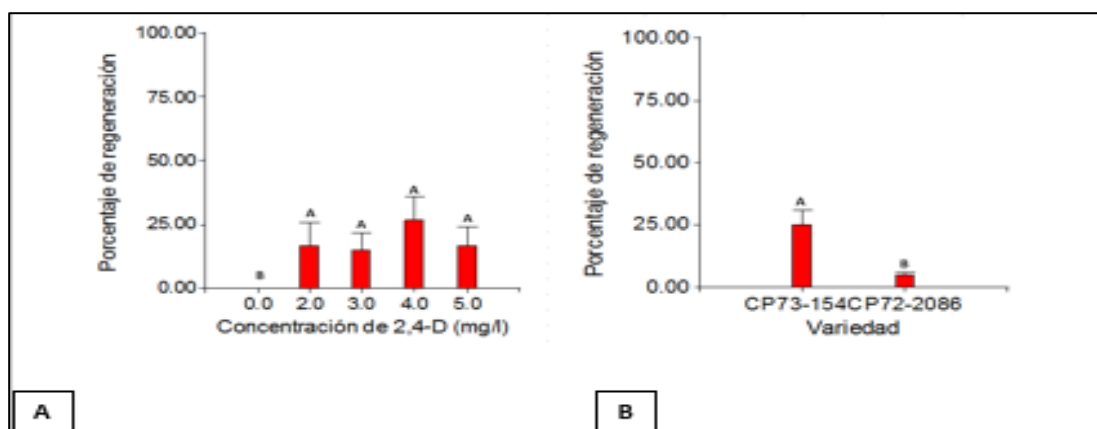
El registro de la respuesta de los explantes, medido como porcentaje de regeneración para cada dosis evaluada, se sometió a un análisis de varianza (Cuadro 14), cuyos resultados mostraron que existen diferencias significativas en la respuesta a las dosis y las variedades.

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 3.

		N CV				
		30	18.18			
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	1.8	13	0.14	2.52	0.0413	
Variedad	0.67	1	0.67	26.29	0.036	(Var*Repe)
Repetición	0.08	2	0.04	0.77	0.4793	
Variedad*Repetición	0.05	2	0.03	0.46	0.6375	
Tratamiento	0.75	4	0.19	3.39	0.0343	
Variedad*Tratamiento	0.25	4	0.06	1.13	0.3758	
Error	0.88	16	0.06			
Total	2.68	29				

El rango de variación entre las dosis estuvo entre 0 % para el control y 26.67 % para la dosis 4 mg/l (Gráfica 7A). Por otra parte, el rango de respuesta de las variedades tuvo un rango de 25.33 % en la variedad CP73-1547 a 4.67 % en la variedad CP72-2086 (Gráfica 7B).

Gráfica 5. Resultados. (A) Porcentaje de regeneración de los explantes de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento3. (B) Medias de tratamientos de la variable porcentaje de regeneración, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 3.



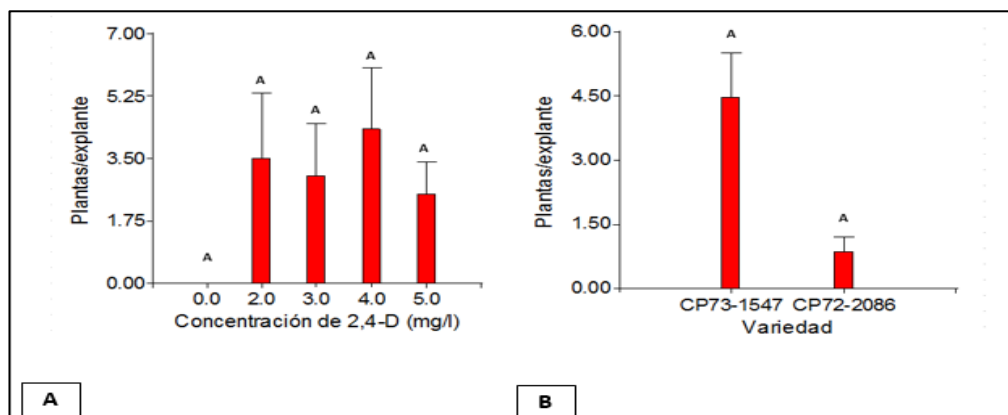
**b. Plantas regeneradas por explante:** El registro de la respuesta de los explantes, medido como plantas regeneradas por explante para cada dosis evaluada, se sometió a un análisis de varianza. Los resultados no mostraron que existan diferencias significativas entre los factores como se aprecia en el Cuadro 15.

Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable plantas por explante, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 3.

		N CV					
		30	7.32				
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)							
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)	
Modelo.	0.24	13	0.02	2.87	0.0244		
Variedad	0.09	1	0.09	11.35	0.078	(Var*Repe)	
Repetición	0.02	2	0.01	1.32	0.2939		
Variedad*Repetición	0.02	2	0.01	1.27	0.3075		
Tratamiento	0.07	4	0.02	2.66	0.0713		
Variedad*Tratamiento	0.04	4	0.01	1.76	0.1858		
Error	0.1	16	0.01				
Total	0.34	29					

En este experimento se puede apreciar que dentro de los tratamientos evaluados con diferentes concentraciones de 2,4-D en la fase de inducción, la variable plantas regeneradas por explante, no muestra diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y variedades. Los tratamientos evaluados variaron entre 4.33 para la dosis de 4 mg/l hasta 0 para el control sin 2,4-D durante 8 días, como lo muestra la Gráfica 5 (A). Por otra parte, el rango de respuesta de las variedades tuvo un rango que varió de 4.47 en la variedad CP73-1547 a 0.87 en la variedad CP72-2086 como se muestra en la Gráfica 5 (B).

Gráfica 6. Resultados. (A) Número de plantas regeneradas por explante, de acuerdo con la dosis de 2,4-D, aplicada en la fase de inducción durante 8 días, variedad CP73-1547, experimento3. (B) Medias de tratamientos de la variable plantas regeneradas por explante, variedades CP73-1547 y CP72-2086, experimento 3.



## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con Franklin *et al.*, (2006), los explantes de hoja expuestos a 2,4-D en el medio de cultivo, durante 8 días, estimulan la regeneración de plantas. En nuestros experimentos efectivamente ocurrió ese estímulo y como consecuencia obtuvimos regeneración de plantas. Si se analizan específicamente los resultados del experimento 3, se mostró que el tratamiento control (sin 2,4-D), no tuvo regeneración de plantas, al contrario de los demás tratamientos. Se espera que esta condición se repita, siempre que el medio de regeneración esté libre de reguladores del crecimiento, como en este experimento. Lo contrario ocurrió en el experimento 2, en el cual sí hubo regeneración de plantas en el tratamiento control. Esto probablemente se debió a que se utilizó un medio de regeneración que contenía bencilaminopurina y ácido naftalenacético a razón de 0.1 mg/l. En otras palabras, la inclusión de los reguladores BAP y ANA en el medio, promovió la regeneración de plantas aún sin el pretratamiento de 2,4-D. Este tipo de regeneración por organogénesis fue reportado por Gill *et al.* (2006) y también por Franklin *et al.*, (2006).

Además, se pudo observar que en el medio conteniendo BAP y ANA del experimento 2, la regeneración fue directa, sin formación de callo, mientras que, en el medio sin reguladores del experimento 3, la regeneración fue indirecta en su mayoría, es decir, con formación de callo y a partir de este, la regeneración de plantas.

De manera general, los resultados mostraron que el rango de dosis de 2,4-D evaluadas en el presente trabajo (2, 3, 4 y 5 mg/l durante 8 días), no difieren en cuanto al porcentaje de regeneración observado en los explantes ni en el número de plantas regeneradas por explante. Además, nuestros porcentajes de regeneración, cuyo máximo fue 33.75 %, distan mucho de los obtenidos por Franklin *et al.*, (2006) con esta metodología (90 %). En los casos en los que se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, estas fueron entre las dosis evaluadas en comparación con el control, pero no entre las dosis. Es probable que el corto tiempo de exposición (8 días) solo alcance para estimular la embriogénesis somática a un mismo nivel, independientemente de la concentración de la auxina. Lo mismo ocurrió con el número de plantas por explante, donde no se encontró efecto de las diferentes dosis. Con base en lo anterior, podemos aceptar las hipótesis nulas del planteamiento estadístico.

A diferencia de lo reportado por Franklin *et al.*, (2006), la respuesta a la regeneración de plantas se mostró dependiente del genotipo, como sucedió en el experimento 2, en el cual, el número de plantas por explante resultó ser superior en la variedad CP72-2086 con 4.28, en comparación con 2.19 para la variedad CP73-1547. Otro efecto del genotipo se manifestó en el hecho de que el mayor porcentaje de regeneración de plantas (33.75 %) se obtuvo en la variedad CP72-2086 cuando la fase de inducción fue de 2 mg/l de 2,4-D durante 8 días, mientras que esa misma dosis

resultó ser la de menor porcentaje de regeneración en la variedad CP73-1547 (2.5 %). La misma situación se manifestó en la variable porcentaje de regeneración en el experimento 3, en el cual, la variedad CP73-1547 mostró el mayor valor con 25.33 %, mientras que la variedad CP72-2086 mostró el menor valor (4.67 %). Este tipo de dependencia genotípica hacia la respuesta *in vitro* ya ha sido reportado por Shiromani *et al.*, (2011) y Kaur & Kapoor (2016). Con base en lo anterior podemos rechazar la hipótesis nula del planteamiento estadístico

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Al evaluar el efecto de las diferentes dosis de 2,4-D como inductor de la regeneración de plantas, no se encontraron diferencias en los tratamientos evaluados respecto al porcentaje de regeneración de plantas.
2. Al evaluar el efecto de las diferentes dosis de 2,4-D como inductor de la regeneración de plantas, no se encontraron diferencias en los tratamientos evaluados respecto al número de plantas por explante.
3. Las variedades evaluadas, CP72-2086 y CP73-1547 mostraron diferentes respuestas tanto al porcentaje de regeneración, como al número de plantas por explante. La primera de ellas mostró mayor respuesta cuando el medio de regeneración contenía BAP y ANA, mientras que la segunda mostró mayor respuesta cuando el medio de regeneración estaba libre de reguladores del crecimiento.

## **X. RECOMENDACIONES**

1. Utilizar la dosis de 2 mg/l de 2,4-D durante 8 días de exposición para la regeneración de plantas por la vía directa, considerando que no existe diferencia en la respuesta al utilizar dosis mayores.
2. Continuar evaluando la respuesta a la regeneración de plantas en otras variedades, que permita aplicar de manera eficiente la técnica de cultivo de tejidos, como apoyo a la mejora genética de la caña de azúcar, lo que a su vez puede aumentar la productividad del cultivo, utilizando nuevas y mejores variedades de interés para CENGICAÑA y toda la agroindustria azucarera.
3. Evaluar el efecto que ejercen otros factores como la edad de la planta que dona los explantes o el tipo de azúcares en el medio de cultivo para afinar la técnica y lograr mayor eficiencia en la regeneración de plantas.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (MARGEN)

- Agvik, Evelyn. (2011). *Enraizamiento y aclimatación de plántulas de Vanilla planifolia Andrews, provenientes de cultivos con fines de conservación*. Recuperado el 1 de febrero de 2017, de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3097.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3097.pdf)
- ASAZGUA, S. A. (2012). *Azúcar de Guatemala desarrollo para todos*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2016, de: <http://www.azucar.com.gt/economia3.html>
- Castañeda-Castro, Odón. (2013). *Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar*. Recuperado el 26 de enero de 2017 de [https://www.researchgate.net/publication/273204624\\_Aplicaciones\\_del\\_cultivo\\_de\\_tejidos\\_vegetales\\_en\\_cana\\_de\\_azucar\\_Saccharum\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/273204624_Aplicaciones_del_cultivo_de_tejidos_vegetales_en_cana_de_azucar_Saccharum_spp)
- Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. 2012. *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala* (512 p.). Guatemala.
- Di Rienzo, J., et al., 2016. *InfoStat*. Córdoba, Argentina.
- Franklin, G., et al., 2006. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* spp. hybrids) midrib segment explant. *Plant Growth Regul.* 50:111-119.
- Gill., R. Malhotra, P., y Gosal, S. (2006). Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 84:227-231.
- Kaur, R. & Kapoor M. (2016). Plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane. *Sugar Tech* 18(1):93-99.
- Levtius, Gabriela, et al., 2004. *Cultivo de tejidos*. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de [http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio\\_WEB.pdf](http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf).
- Molina, Luis 2012. *Saneamiento de material vegetal mediante cultivo de meristemas de caña de azúcar (Saccharum spp. Híbridos) y desarrollo de protocolos de multiplicación in vitro*. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de <http://www.cengicana.org/es/publicaciones/libro-de-la-cana-de->

azucar/memorias/Memoria-Presentaci%C3%B3n-de-Resultados-de-Investigaci%C3%B3n-2011-2012/2.Variedades/Biotecnolog%C3%ADa/Saneamiento-de-Material-Vegetal-Mediante-Cultivo-de-Meristemos-de-Ca%C3%B1a-De-Az%C3%BAcar-(Saccharum-Spp.-H%C3%ADbridos)-y-Desarrollo-de-Protocolos-de-Multiplicaci%C3%B3n-In-Vitro/.

Orozco, Héctor y Buc, Rafael. 2016. *Censo de variedades de caña de azúcar para la zafra 2015-16 en guatemala* Recuperado el 5 de noviembre de 2016 de <http://www.cengicana.org/es/mapas-zona-canera/memorias/Memoria-Presentaci%C3%B3n-de-Resultados-de-Investigaci%C3%B3n-2014-2015/1.-Variedades/1.-Variedades/Censo-de-variedades-de-Ca%C3%B1a-de-Az%C3%BAcar-para-la-Zafra-2015-2016-en-Guatemala/>.

Perafán, Felipe. 2009. *Azúcar de caña*. Recuperado el 7 de noviembre de 2016 de <http://www.perafan.com/azucar/ea02cana.html>

Scowcroft, L. 1981. *Curso Cultivo de Tejidos Vegetales*. Extraído el 3 de noviembre de 2016 de <http://cursocultivodetejidosvegetales.blogspot.com/2011/09/variacion-somaclonal.html>

Shiromani, W. *et al.*, 2011. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic of diverse proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. *Plant Cell Reports*. 30:439-448.

## XII. APÉNDICE

### A. Resultados de experimentos

Cuadro 15. Resultados de experimento 1, variedad CP73-1547.

Tratamiento	Variedad	Repetición	Explantos		PorcReg	Presencia de raíz	Presencia de callo
			con regeneración	Plantas/explante			
1	CP73-1547	1	0	0	0	0.00	No
1	CP73-1547	2	0	0	0	0.00	No
1	CP73-1547	3	0	0	0	0.00	No
2	CP73-1547	1	4	0	0	0.00	Sí
2	CP73-1547	2	4	4	40	0.40	No
2	CP73-1547	3	4	2	40	0.40	No
3	CP73-1547	1	1	1	10	0.10	No
3	CP73-1547	2	2	3	0	0.00	Sí
3	CP73-1547	3	0	0	0	0.00	No
4	CP73-1547	1	5	10	50	0.50	No
4	CP73-1547	2	0	0	0	0.00	Sí
4	CP73-1547	3	4	9	40	0.40	Sí
5	CP73-1547	1	2	8	20	0.20	Sí
5	CP73-1547	2	2	4	20	0.20	No
5	CP73-1547	3	1	9	40	0.40	Sí

Cuadro 16. Resultados de experimento 2, variedad CP73-1547 y CP72-2086.

Tratamiento	Variedad	Repetición	Explantos			PorcReg	Presencia	
			con regeneración	Plantas/explante	de Raíz		de callo	
1	CP73-1547	1	1	5	35	0.35	Si	No
2	CP73-1547	1	1	1	10	0.1	No	Si
4	CP73-1547	1	3	8	30	0.3	No	Si
5	CP73-1547	1	2	3.5	15	0.15	No	Si
1	CP72-2086	1	0	6	35	0.35	No	No
2	CP72-2086	1	6.5	10	45	0.45	No	Si
4	CP72-2086	1	3.5	2.5	20	0.2	Si	No
5	CP72-2086	1	3.5	8.5	30	0.3	No	No
1	CP73-1547	2	0	8.5	45	0.45	No	Si
2	CP73-1547	2	0	0	0	0.0	Si	No
4	CP73-1547	2	0	0	0	0.0	Si	No
5	CP73-1547	2	1	1	10	0.1	Si	No
1	CP72-2086	2	0	3	20	0.2	Si	No
2	CP72-2086	2	2.5	5.5	25	0.25	Si	No
4	CP72-2086	2	0.5	0.5	5	0.05	Si	No
5	CP72-2086	2	1	1.5	10	0.1	Si	No
1	CP73-1547	3	1.5	2.5	15	0.15	No	No
2	CP73-1547	3	0	0	0	0.0	Si	No
4	CP73-1547	3	2	3	20	0.2	No	No
5	CP73-1547	3	1	1.5	8.3	0.8	No	Si
1	CP72-2086	3	0	3.5	20	0.2	Si	No
2	CP72-2086	3	4.5	12.5	45	0.45	Si	No
4	CP72-2086	3	0	0	0	0.0	Si	No
5	CP72-2086	3	0.5	1	5	0.05	Si	No
1	CP73-1547	4	0	0	0	0.0	Si	No
2	CP73-1547	4	0	0	0	0.0	Si	No
4	CP73-1547	4	1	1	10	0.1	Si	No
5	CP73-1547	4	0	0	0	0	Si	No
1	CP72-2086	4	0.5	1.5	5	0.05	No	No
2	CP72-2086	4	2	3.5	20	0.2	No	No
4	CP72-2086	4	3.5	9	35	0.35	Si	No
5	CP72-2086	4	0	0	0	0	Si	No

Cuadro 17. Resultados de experimento 3, variedad CP73-1547 y CP72-2086.

Tratamiento	Repetición	Variedad	Explantos				Presencia de Raíz	Presencia de callo
			con regeneración	Plantas/explante	PorcReg	de Raíz		
1	1	CP73-1547	0	0	0	No	No	
2	1	CP73-1547	0	0	0	Sí	Sí	
3	1	CP73-1547	0	0	0	Sí	No	
4	1	CP73-1547	5	6	50	Sí	Sí	
5	1	CP73-1547	5	6	50	Sí	Sí	
1	1	CP72-2086	0	0	0	No	No	
2	1	CP72-2086	1	3	10	No	Sí	
3	1	CP72-2086	0	0	0	Sí	Sí	
4	1	CP72-2086	1	1	10	Sí	Sí	
5	1	CP72-2086	0	0	0	Sí	Sí	
1	2	CP73-1547	0	0	0	No	No	
2	2	CP73-1547	4	10	40	No	No	
3	2	CP73-1547	3	7	30	No	No	
4	2	CP73-1547	5	8	50	No	No	
5	2	CP73-1547	2	3	20	Sí	Sí	
1	2	CP72-2086	0	0	0	No	No	
2	2	CP72-2086	0	0	0	Sí	Sí	
3	2	CP72-2086	1	1	10	Sí	Sí	
4	2	CP72-2086	0	0	0	No	Sí	
5	2	CP72-2086	1	1	10	Sí	Sí	
1	3	CP73-1547	0	0	0	No	No	
2	3	CP73-1547	5	8	50	Sí	No	
3	3	CP73-1547	4	8	40	No	No	
4	3	CP73-1547	4	10	40	No	No	
5	3	CP73-1547	1	1	10	Sí	Sí	
1	3	CP72-2086	0	0	0	No	No	
2	3	CP72-2086	0	0	0	Sí	Sí	
3	3	CP72-2086	0	0	0	Sí	Sí	
4	3	CP72-2086	1	2	10	No	Sí	
5	3	CP72-2086	1	1	10	Sí	Sí	
1	4	CP72-2086	1	4	10	Sí	Sí	
2	4	CP73-1547	0	0	0	No	No	

## Continuación Cuadro 17

2	4	CP73-1547	1	1	10	0.1	Sí	No
4	4	CP73-1547	0	0	0	0	No	No
1	4	CP72-2086	0	0	0	0	No	No
3	4	CP72-2086	1	4	10	0.1	Sí	Sí
4	4	CP72-2086	0	0	0	0	Sí	Sí
5	4	CP72-2086	0	0	0	0	No	Sí
1	5	CP73-1547	0	0	0	0	No	No
1	5	CP72-2086	0	0	0	0	No	No

## **B. Procesos extras:**

### **1. Proceso de esterilización de pinzas, frascos, cajas Petri y agua desmineralizada:**

- a. Se procedió a tomar grupos de 3 pinzas grande, media y pequeña y se colocaron en una bolsa de papel tapando la entrada de la bolsa con tape especial de autoclave y todo agujero que esta tenga.
- b. A los frascos previamente limpios con agua y jabón común (secos), se les colocó papel aluminio por encima, cubriéndolos sin ningún tipo de líquido por dentro.
- c. A las cajas Petri de vidrio se les colocó en una bolsa de papel y se selló.
- d. El agua desmineralizada fue introducida en un frasco con tapadera esta no debe ir completamente cerrada para evitar que estalle.
- e. Posteriormente se les colocó en una bandeja de metal especial para autoclave.
- f. Antes de meter los instrumentos al autoclave se llenó por dentro con agua desmineralizada con aproximadamente 5 l de capacidad.
- g. Se procedió a introducir la bandeja, se cierra cuidadosamente y se encendió con el timer dejándolo correr durante 15 minutos.
- h. Es posible que tarde en subir la presión a 18 PSI y a una T° de 120 °C, aproximadamente durante 15 minutos, desde el momento que llegó a la presión y temperatura comenzó a correr 15 minutos para esterilizar.
- i. Al momento que termine de correr los 15 minutos de esterilización se dejó enfriar y disminuir la temperatura aproximadamente por 15 minutos más.
- j. Este proceso es recomendado hacerlo un día antes como mínimo para su utilización posterior.

**2. Proceso de lavado de cristalería e instrumentos:** Este se realizó después de cada labor realizada. Los frascos de procesos anteriores o procesos de preparación de medio, se lavaron con esponja y jabón líquido común para facilitarlos, luego se le dejó secar en bandejas especiales. Al momento que estén secos se guardaron en sus respectivos lugares.

### **3. Proceso de esterilizado de cámara de flujo:**

- a. Se procedió a encender la cámara de flujo tanto el aire como la luz de esta.
- b. Se quitó todo artefacto que este dentro de ella, y se colocó por aparte alejado lo más posible de esta, al igual que los objetos que se encuentren en la bandeja de apoyo de

3 niveles. Estos objetos pueden ser: mechero, papel mayordomo, contenedores con alcohol al 70%-96%.

- c. Con la ayuda del papel mayordomo y el alcohol al 70% se procedió a desinfectar tanto la bandeja como la cámara de flujo, limpiando cuidadosamente techo, paredes (incluyendo donde se conduce el aire) y base de trabajo.
- d. Se repitió el proceso con alcohol al 96%.
- e. Posteriormente se le agregó un poco de alcohol al 96% a la base únicamente y se flameó con la ayuda de un encendedor, se dejó enfriar por unos minutos y luego se procedió a introducir mechero, tijeras, pinzas, parafilm etc. (todos estos rociados con alcohol etílico al 70% excepto el mechero y frasco estéril con alcohol).

### C. Laboratorio de biotecnología de Cengicaña:

#### 1. Normas del laboratorio de Biotecnología:

- a. Lavarse las manos antes de iniciar cualquier actividad dentro del área de laboratorio.
- b. Obligatorio el uso de bata en las áreas de color rojo y amarillo.
- c. Mientras se manipule cualquier sustancia en polvo se requiere uso de mascarilla.
- d. Para evitar contaminación durante los procedimientos cultivo in -vitro utilizar instrumentos esterilizados.
- e. Se debe utilizar lentes para trabajar con luz ultra violeta.
- f. Siempre utilizar guantes en el área de electroforesis.
- g. Utilizar guantes para manipular cualquier ácido.
- h. Utilizar guantes de protección térmica al sacar material de autoclave.
- i. Prohibido comer o beber en las áreas de color rojo y amarillo.

Cuadro 15. Distribución de áreas del laboratorio de Biotecnología.

Color	Significado	Indicaciones y precisiones
Rojo	Señal de prohibición. Peligro-alarma. Material y equipos de lucha contra incendios.	Comportamientos peligrosos. Alto, parada, dispositivos de desconexión, emergencia, evacuación. Identificación y localización.
Amarillo	Señal de advertencia	Atención, precaución, verificación
Verde	Señal de salvamento o de auxilio.	Puertas, salidas, pasajes, material, puestos de salvamento o de socorro locales.

Cuadro 16. Indicaciones y precisiones de áreas del laboratorio de Biotecnología

Cultivo de tejido Marcadores Moleculares Electroforesis
Reactivos Incubadoras Preparación de medios
Área de lavado Oficina

Ilustración 19. Distribución de áreas del laboratorio de Biotecnología. (A) Área de materiales y equipos contra incendios. (B) Área de señal de advertencia. (C) Área de salvamento o de auxilio.



