

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES

EFFECTO DEL CULTIVO *in vitro* SOBRE LA VARIACIÓN
GENÉTICA Y FENOTÍPICA EN CAÑA DE AZÚCAR VARIEDAD CG98-10
TESIS DE GRADO

ALDO OMAR SALAZAR OCHOA
CARNET 21007-08

ESCUINTLA, FEBRERO DE 2015
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES

EFFECTO DEL CULTIVO *in vitro* SOBRE LA VARIACIÓN
GENÉTICA Y FENOTÍPICA EN CAÑA DE AZÚCAR VARIEDAD CG98-10
TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

POR
ALDO OMAR SALAZAR OCHOA

PREVIO A CONFERÍRSELE
EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES EN EL GRADO
ACADÉMICO DE LICENCIADO

ESCUINTLA, FEBRERO DE 2015
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR:	P. EDUARDO VALDES BARRIA, S. J.
VICERRECTORA ACADÉMICA:	DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN:	DR. CARLOS RAFAEL CABARRÚS PELLECCER, S. J.
VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA:	P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO:	LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS
SECRETARIA GENERAL:	LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

DECANO:	DR. ADOLFO OTTONIEL MONTERROSO RIVAS
VICEDECANA:	LIC. ANNA CRISTINA BAILEY HERNÁNDEZ
SECRETARIA:	ING. REGINA CASTAÑEDA FUENTES
DIRECTOR DE CARRERA:	MGTR. LUIS MOISÉS PEÑATE MUNGUÍA

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

MGTR. JOSE LUIS QUEME DE LEON

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. HÉCTOR ALFREDO SAGASTUME MENA

ING. LUIS GERARDO MOLINA MONTERROSO

LIC. CARLOS DANILO SANTIZO SOLLER

Guatemala, febrero 19 de 2015

**Honorable Consejo
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Campus Central Universidad Rafael Landívar
Guatemala**

Honorables Señores:

Por este medio comunico a ustedes que he concluido la asesoría al estudiante Aldo Omar Salazar Ochoa en el trabajo de tesis titulado

**EFFECTO DEL CULTIVO *in vitro* SOBRE LA VARIACION GENETICA Y FENOTIPICA
EN CAÑA DE AZUCAR VARIEDAD CG98-10.**

Para el desarrollo de dicha tesis se necesitó el conocimiento de descriptores de caracterización de la caña de azúcar, multiplicación de semilla agámica, cultivo *in vitro*, marcadores moleculares y métodos estadísticos multivariados.

Por el aporte técnico y científico de ésta investigación y por ser uno de los primeros trabajos que se han realizado en variación genética y fenotípica, no tengo ningún inconveniente en emitir ésta carta de aprobación, puesto que reúne los requisitos que exige la facultado previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciado.

Atentamente,



Dr. José Luis Quemé de León

Colegiado No. 636



Universidad
Rafael Landívar
Tradición Jesuita en Guatemala

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
No. 06255-2015

Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante ALDO OMAR SALAZAR OCHOA, Carnet 21007-08 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES, de la Sede de Escuintla, que consta en el Acta No. 063-2015 de fecha 31 de enero de 2015, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

EFFECTO DEL CULTIVO *in vitro* SOBRE LA VARIACIÓN
GENÉTICA Y FENOTÍPICA EN CAÑA DE AZÚCAR VARIEDAD CG98-10

Previo a conferírsele el título de INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES en el grado académico de LICENCIADO.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 19 días del mes de febrero del año 2015.



ING. REGINA CASTAÑEDA FUENTES, SECRETARIA
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
Universidad Rafael Landívar



AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDIVAR:

Por ser el centro de estudios que me permitió formarme como profesional y a quien debo este importante logro

A MI ASESOR:

Dr. José Luis Quemé de León.

Por apoyarme en la concepción, diseño y ejecución de la investigación, así como la asesoría, revisión y corrección del informe final.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE CENGICAÑA:

Ing. Luis Gerardo Molina Monterroso, Carlos Maddaleno y Victoriano Sut.

Por el apoyo que recibí de ellos para la ejecución de la investigación, así como su aporte en la obtención de los resultados de laboratorio.

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO:

Carlos Pérez y Julio Pérez.

Agradecimiento especial por el apoyo brindado durante el manejo del experimento en campo.

A CENGICAÑA:

Institución fundamental en el desarrollo de mi carrera, me brindó el apoyo para continuar con mi formación profesional, además de proveerme los recursos necesarios para el desarrollo de la investigación.

DEDICATORIA

A DIOS: Por acompañarme en todo momento, brindándome sabiduría para lograr superarme profesionalmente y por bendecirme con el alcance de éste importante éxito.

A MI PADRE: Walter Homero Salazar Barrios (Q.E.P.D.). Por inculcarme los valores éticos y morales, que me han servido en el desarrollo personal y profesional de mi vida.

A MI MADRE: Sabina Cristina Ochoa y Ochoa. A ella debo lo que soy, porque con su trabajo logró sacarme adelante. Por su amor y apoyo incondicional le dedico este triunfo, como señal de recompensa a sus múltiples sacrificios.

A MIS HERMANOS: Alexander, Erick, Denis, Kevin, Roger. Por los consejos y apoyo moral brindado. Gracias por formar parte de mi formación personal y profesional.

A MI ESPOSA E HIJA: Ingrid Mariana Robles Hidalgo y Ashley Mariana Sherlyn Salazar Robles. Por su amor, cariño, comprensión y apoyo incondicional en esta etapa de mi vida. Les dedico este logro porque ustedes son la razón de mis luchas.

INDICE GENERAL

Capítulo	Contenido	Página
	RESUMEN	i
	SUMMARY	ii
I.	INTRODUCCION	1
II.	MARCO TEORICO	2
	2.1 Cultivo de tejidos	3
	2.1.1 Cultivo de tejidos en caña de azúcar	4
	2.2 Variación somaclonal en cultivo de tejidos	5
	2.3 Caracterización molecular de la diversidad	6
	2.4 Caracterización morfológica de la diversidad	7
	2.4.1 El tallo	8
	2.4.2 La hoja	11
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
	3.1 Planteamiento del problema y justificación de la investigación	15
IV.	OBJETIVOS	16
	4.1 General	16
	4.2 Específicos	16
V.	HIPOTESIS	17
VI.	METODOLOGIA	18
	6.1 Localización	18
	6.2 Material experimental	18
	6.3 Factor estudiado	19
	6.4 Descripción de los tratamientos	19
	6.5 Diseño experimental	20
	6.6 Modelo estadístico	20
	6.7 Unidad experimental	20
	6.8 Croquis de campo	20
	6.9 Etapas y manejo del experimento	20
	6.9.1 Multiplicación <i>in vitro</i>	21
	6.9.2 Aclimatación	23

Capítulo	Contenido	Página
	6.9.3 Trasplante	23
	6.9.4 Caracterización molecular	23
	6.9.5 Caracterización morfológica	25
	6.10 Variables de respuesta	25
	6.10.1 Patrones de bandas de los tratamientos	25
	6.10.2 Características morfológicas de las plantas	25
	6.11 Análisis de la información	27
	6.11.1 Variación genética	27
	6.11.2 Variación fenotípica	28
VII.	RESULTADOS Y DISCUSION	29
	7.1 Caracterización molecular	29
	7.1.1 Análisis de los marcadores moleculares	29
	7.1.2 Análisis de la matriz de distancias genéticas	29
	7.1.3 Análisis gráfico de las distancias genéticas	30
	7.2 Caracterización morfológica	32
VIII.	CONCLUSIONES	34
IX.	RECOMENDACIONES	35
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36
XI.	ANEXOS	41

INDICE DE CUADROS

No.	Contenido	Página
Cuadro 1.	Descripción de los tratamientos evaluados.	19
Cuadro 2.	Forma de medición de las características morfológicas de las plantas.	26
Cuadro 3.	Bandas amplificadas de microsatélites del estudio de comparación de subcultivos en caña de azúcar, variedad CG98-10.	29
Cuadro 4.	Matriz de coeficientes de distancia (1 – S) de los tratamientos evaluados.	30
Cuadro 5.	Descripción de las características morfológicas de los tratamientos.	33
Cuadro 6.	Matriz binaria de datos generados por los marcadores microsatélite.	42
Cuadro 7.	Características morfológicas de los individuos evaluados.	46

INDICE DE FIGURAS

No.	Contenido	Página
Figura 1.	Formas de entrenudo: A, cilíndrico, B, abarrilado; C, constreñido; D, conoidal; E, obconoidal; y F, curvo.	9
Figura 2.	Formas de nudo: A, cilíndrico; B, constreñido; C, conoidal; D, obconoidal.	10
Figura 3.	Formas de la yema	11
Figura 4.	Tipos de cuello de la hoja: A, deltoide; B deltoide acampanado; C, deltoide descendente; D, deltoide doble creciente; E, deltoide deltoide cuadrado; F, cuadrado ascendente; G, cuadrado sub-creciente; H, cuadrado alto; I, cuadrado creciente; J, cuadrado estrecho; K, ligular ascendente; L, ligular acampanado; M, doble creciente estrecho; N, ligular estrecho; O, doble creciente ancho; P, cuadrado acampanado.	12
Figura 5.	Tipos de aurículas: A, aurícula ausente; B, transicional; C, aurícula interior calcariforme; D, ambas lanceoladas; E, ambas aurículas transicional pero una transicional descendente; F, transicional inclinada; G, recta; H, transicional ascendente; I, dentada; K, deltoide; L, lanceolada corta; M, unciforme; N, calcariforme; O, falcata; P, lanceolada larga.	13
Figura 6.	Formas de lígulas por grupos. A, Creciente; B, Forma de Correa; C, Deltoide; D, Arqueada.	14
Figura 7.	Variedad CG98-10.	18
Figura 8.	Desinfección superficial de ápices de caña de azúcar	21
Figura 9.	Corte del cilindro foliar para la obtención de discos foliares	22
Figura 10.	Siembra de discos foliares en medio de cultivo	22
Figura 11.	Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre los tratamientos evaluados, obtenido con el método de agrupamiento jerárquico UPGMA	31
Figura 12.	Croquis de campo	41

EFFECTO DEL CULTIVO *in vitro* SOBRE LA VARIACION GENETICA Y FENOTIPICA EN CAÑA DE AZUCAR VARIEDAD CG98-10.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del cultivo *in vitro* sobre la variación genética y fenotípica en la variedad de caña de azúcar CG98-10, a través de la caracterización molecular y morfológica. El estudio se realizó en las instalaciones de CENGICAÑA, produciendo plantas por cultivo *in vitro*, hasta un máximo de nueve subcultivos, evaluando los subcultivos 3, 6 y 9, junto con un testigo absoluto. Se utilizó el diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. Las variables de respuesta fueron los patrones de bandas de los tratamientos y las características morfológicas de las plantas (entrenudo, nudo, yema, cuello, aurícula y lígula). El estudio concluye que al multiplicar la variedad CG98-10 a través de cultivo de tejidos existe un efecto sobre la variación genética de las plantas. El análisis de las características fenotípicas de las plantas producidas *in vitro* muestra que no existe ningún efecto para las seis características consideradas, ocasionado por el incremento en el número de subcultivos. Se recomienda evaluar otras variedades de importancia para la Agroindustria Azucarera Guatemalteca, para determinar si son afectadas fenotípica y genotípicamente por el incremento en el número de subcultivos *in vitro*. Asimismo, para que los datos de esta investigación sean validados, se recomienda que cuando se multipliquen plantas por cultivo *in vitro* se realice el análisis molecular a los materiales resultantes de los subcultivos, con la finalidad de disponer de información que pueda medir la efectividad del cultivo *in vitro* en cuanto a pureza genética.

EFFECT OF *in vitro* CULTURE ON THE GENOTYPIC AND PHENOTYPIC VARIATION IN SUGARCANE VARIETY CG98-10.

SUMMARY

The objective of this study was to assess the variation on the genotype and phenotype caused by tissue culture propagation of sugarcane variety CG98-10, by molecular and morphologic characterization. The study was done at the CENGICANA facilities, where plants were regenerated from leaf discs and micropropagated up to nine subcultures. Plants from subculture 3, 6 and 9 as well as control plants were evaluated. A completely random design with four replications was used and the variables measured were the DNA bands obtained by polyacrylamide gel electrophoresis and the morphological traits (node, internode, bud, neck, auricle, and ligule). It was concluded that propagating sugarcane variety CG98-10 by tissue culture produced genotypic variation among the plants. The analysis made to morphological traits showed no effect for any of the six measured variables. It is recommended to evaluate other important varieties and making molecular analysis to the plants obtained by micropropagation in order to measure the effectiveness of the *in vitro* culture on maintaining genetic purity.

I. INTRODUCCION

La caña de azúcar es un cultivo de mucha importancia en Guatemala. El país se encuentra posicionado como el cuarto mayor exportador de azúcar en el mundo, segundo en Latinoamérica, y tercero en productividad a nivel mundial. En la zafra 2013/14, la producción de azúcar fue de 2.81 millones de toneladas métricas. La agroindustria azucarera representa el 31 % del valor total de la exportación agrícola guatemalteca y 15.36 % de las exportaciones totales del país. Además, genera 425,000 empleos directos e indirectos. Durante el año 2013 el azúcar y la melaza produjeron un ingreso de 978.1 millones de dólares (ASAZGUA, 2015).

En consecuencia de tal importancia, la industria azucarera ha realizado grandes inversiones en investigación para el desarrollo del cultivo. Uno de los aspectos a los que se ha hecho bastante énfasis es a la propagación de variedades de alto rendimiento utilizando técnicas tradicionales, y más recientemente utilizando biotecnología. Una de las aplicaciones que tiene la biotecnología en caña de azúcar es el cultivo de tejidos como medio de propagación de semilla. Este método asegura una alta tasa de multiplicación de semilla y generación de plantas sanas.

El problema de aplicar la técnica de cultivo de tejidos en la propagación de semilla de caña de azúcar radica en que en ocasiones las plantas manifiestan variantes somaclonales, con lo que se elimina por completo la posibilidad de mantener la pureza varietal del material obtenido. Debido a las múltiples ventajas que ofrece la propagación por cultivo de tejidos frente a la propagación tradicional por esquejes, es necesario conocer acerca de las variantes que puedan manifestarse conforme se incrementa el número de subcultivos. Esto con la finalidad de producir semilleros de alta calidad genética.

Por lo tanto, en esta investigación se evaluó el efecto del número de subcultivos en la variación genética y fenotípica de plantas de caña de azúcar variedad CG98-10, provenientes del cultivo *in vitro*. El efecto fue evaluado mediante la caracterización molecular y morfológica de las plantas obtenidas en los subcultivos 3, 6 y 9, teniendo como testigo plantas producidas tradicionalmente. Con la información generada se logró conocer el número máximo de subcultivos que pueden realizarse sin modificar las características de la variedad original. Este estudio fue llevado a cabo en las instalaciones del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA).

II. MARCO TEORICO

Unos de los pilares básicos para lograr una buena productividad de caña de azúcar al momento de la cosecha es sin duda la producción de semilla de alta calidad. La utilización de esta semilla al momento de la siembra es vital y es el comienzo de una buena cosecha que asegure una adecuada producción (Quemé, 2012).

Como técnica tradicional, en el cultivo de caña de azúcar se incrementa el material vegetativo por el método de siembra de esquejes en campo, para su uso como semilla. Esto permite una tasa de multiplicación de 1 a 10 en siete meses (López, Ovalle, Orozco y Quemé, 2003). Esto significa que por una planta de caña propagada pueden obtenerse un máximo de 10 plantas en siete meses.

Debido a esta baja tasa de multiplicación se estudiaron el uso de técnicas como el cultivo de tejidos, el cual permite tasas de multiplicación mayores, que en CENGICAÑA han sido del orden de 1 hasta 14,000 en siete meses. Esto quiere decir que por cada planta de caña de azúcar micropropagada pueden obtenerse hasta un máximo de 14,000 plantas en un período de siete meses. Un beneficio adicional de esta técnica es que aplicando el proceso adecuadamente, permite la obtención de material vegetativo libre de enfermedades sistémicas, como lo reportaron López *et al.* (2003).

Muchas son las ventajas que presenta el cultivo de tejidos vegetales. A las mencionadas se les pueden agregar las siguientes: a) se pueden conservar una gran cantidad de individuos, utilizando menos área, es de fácil manejo y los costos son menores; b) mayores probabilidades y facilidades en el intercambio de material vegetal a nivel internacional, debido a que no existe peligro alguno respecto a la introducción de enfermedades; c) eliminación del proceso de cuarentena en la introducción de variedades; d) regeneración de plantas sanas a partir de explantes provenientes de plantas enfermas; e) se pueden multiplicar en cualquier época del año; entre otras. Una de sus desventajas es el requerimiento de instalaciones, equipo y mano de obra especializados (Acevedo *et al.*, 2002; Arribas, 1997; Molina y Melgar, 2012; Navarro y Vera, 1991).

2.1 Cultivo de tejidos

La técnica de cultivo de tejidos se viene utilizando hace poco más de 150 años. Desde entonces, la técnica ha abarcado tejidos, órganos y células vegetales. La técnica consiste en cultivar desde apéndices de raíz y tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, embriones maduros o inmaduros, hasta segmentos de órganos de tallo y hoja o inclusive plantas completas. Esto se cultiva sobre un medio nutritivo adecuado y en forma aséptica que se formula especialmente para el caso, el cual difiere respecto a la especie que se quiera cultivar, en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (Navarro y Vera, 1991).

Desde un principio se ha atribuido al botánico alemán Gottlieb Haberlandt la visión, el establecimiento del propósito y el potencial del cultivo de células y tejidos aislados, todo esto en el año 1902. Sin embargo, a pesar de sus esfuerzos, no logró demostrar sus ideas con experimentos, debido a que no observó división celular. La técnica de cultivo de tejidos vegetales tiene su fundamento en el concepto de la totipotencia celular. Esta consiste en la capacidad que tiene una célula para dividirse y formar una planta completa (Molina y Melgar, 2012; Navarro y Vera, 1991).

Muchas son las aplicaciones del cultivo *in vitro*, sin embargo, Acevedo *et al.* (2002) definieron que una de las más utilizadas es la multiplicación de plantas. La verdadera industria de la micropropagación se estableció entre los años 1970 y 1980, la cual ha sido utilizada para definir las diferentes técnicas empleadas en la multiplicación de plantas *in vitro*.

En los últimos años esta técnica se ha constituido en una herramienta de gran importancia. Principalmente ha sido aplicada comercialmente, dadas las ventajas que posee frente a las técnicas tradicionales de multiplicación de semilla básica en cultivares que se les dificulta la producción de semilla de manera sexual. Se ha utilizado con mayor frecuencia para diversos usos, entre los cuales se encuentran la selección de plantas, cruzamientos, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de cosecha. La utilización de ésta técnica abarca diferentes plantas, desde hortalizas, forestales y frutales (Acevedo *et al.*, 2002; Arribas, 1997; Molina y Melgar, 2012; Navarro y Vera, 1991).

En cuanto a medios nutritivos para cultivar tejidos, Murashige y Skoog desarrollaron en 1962 un medio con el cual lograron un rápido crecimiento en tejidos de tabaco. Las sales inorgánicas de

ese medio de cultivo se usan en la actualidad con bastante éxito en casi todas las especies para la mayoría de las investigaciones, pues resultó bastante efectivo (Navarro y Vera, 1991).

Dados los múltiples beneficios que se le conocen al cultivo de tejidos ésta técnica no ha sido ajena a las principales industrias de Guatemala. Desde hace algunos años se viene aplicando en cultivos como banano, plátano y caña de azúcar (Quemé, 2012).

2.1.1 Cultivo de tejidos en caña de azúcar

Respecto al cultivo de tejidos en caña de azúcar, Evans *et al.* y Soto en 1883 y 1994 respectivamente, encontraron que las primeras investigaciones se desarrollaron en Hawái en 1961, en el “Hawaiian Sugarcane Research Center”. Posteriormente, en Taiwán a partir de 1970, se iniciaron las investigaciones de cultivos de tejidos y células para el mejoramiento de la caña de azúcar. Esto tuvo lugar en el “Taiwán Sugar Research Institute” (Arribas, 1997).

Existen dos formas de regenerar plantas de caña de azúcar: de forma directa o indirecta. Esto se efectúa a partir de explantes, considerando un explante como cualquier parte de la planta. Tanto la forma directa como la indirecta pueden regenerarse por organogénesis (órganos) o por embriogénesis (embriones). La forma indirecta implica la formación inicial de un callo y la posterior regeneración de plantas. Se le denomina callo a un conjunto de masas celulares que se forman a través del continuo crecimiento y división de células, que no se diferencian en ningún órgano o tejido específico. Existen reportes de regeneración de plantas de caña de azúcar de forma directa, a partir de segmentos de hojas jóvenes. También se ha reportado regeneración indirecta a partir de callo proveniente de semillas germinadas, de primordios foliares y de meristemas apicales (Molina y Melgar, 2012).

Heinz y Mee realizaron investigaciones en el año 1969, en donde regeneraron plantas a partir de callo en caña de azúcar, es decir de forma indirecta (Molina y Melgar, 2012). Por otro lado, Gill, Malhotra y Gosal (2006) realizaron cultivo de tejidos en caña de azúcar a través de regeneración directa de brotes a partir de segmentos de hojas jóvenes de las variedades CoJ64, CoJ83 y CoJ86. En este ensayo los explantes fueron inoculados en un medio basado en las sales de Murashige y Skoog. Esta regeneración de plantas ocurre a través de organogénesis.

Por medio de embriogénesis somática también se ha efectuado regeneración de plantas. Existe un reporte de un ensayo realizado en el año 1983 en donde Ho y Vasil indujeron la formación de callo embriogénico en segmentos de hojas jóvenes de caña de azúcar en un medio de Murashige y Skoog (MS) (Molina y Melgar, 2012).

En Guatemala se le ha dado mucha importancia al cultivo de tejidos y se han venido haciendo diversas investigaciones para definir las aplicaciones que tiene para la caña de azúcar. Incluso algunos ingenios de la agroindustria azucarera guatemalteca cuentan con laboratorios de micropropagación que realizan investigaciones y, algunos otros, ya aplican esta técnica para la limpieza y multiplicación de semilla, con el objeto de mantenerla libre de enfermedades (Molina y Melgar, 2012).

2.2 Variación somaclonal en cultivo de tejidos

A pesar de las ventajas que presenta el cultivo de tejidos en plantas de caña de azúcar se ha detectado variación somaclonal (o variabilidad somaclonal), la cual puede producirse en el cultivo *in vitro*. Esta consiste en variabilidad genética que se genera en las plantas mediante la inducción de mutaciones. Estas mutaciones ocurren como consecuencia de errores en la replicación del ADN, debido al proceso de multiplicación acelerada que se requiere al cultivar plantas *in vitro* de caña de azúcar (Molina y Melgar, 2012).

Respecto a la variación somaclonal, Leopold define dos causas que la provocan en cultivo *in vitro*. Estas causas son: los componentes del medio de cultivo y la edad de los cultivos *in vitro* (Pérez, 1991).

En un estudio realizado por Oropeza, Guevara, de García y Ramírez (1995) se encontraron dos variantes somaclonales: AT626 y BT627. Estas variantes fueron obtenidas por embriogénesis somática a partir del cultivar PR62-258, al aumentar el número de subcultivos en un medio MS con 3 mg/L de 2,4-D. Concluyeron que este fenómeno no es del todo negativo, ya que puede ser aprovechado para generar variedades con características deseables a la producción, puesto que los materiales que evaluaron se mostraron resistentes al mosaico de la caña de azúcar (SCMV) durante siete años en pruebas de campo. Sin embargo, no es deseable que ocurran variantes somaclonales cuando el principal objetivo es la multiplicación de plantas que

mantengan las características genéticas de la planta madre durante el proceso de cultivo de tejidos.

Se han efectuado diversos estudios para evaluar la variabilidad producida por los cultivos *in vitro*. En el año 1986, Nagai y Schnell compararon una población obtenida a través de cultivo de tejidos con un híbrido F₂ de *Saccharum erianthus*, en donde estudiaron sus caracteres agronómicos y concluyeron que en algunos de los caracteres evaluados el cultivo de tejidos produjo una variabilidad similar a la obtenida a través del proceso de cruzamiento (Pérez, 1991).

Por otro lado, en un estudio realizado por del Toro, Martín, Saucedo y Linacero (1991) se encontraron importantes variantes en indicadores morfológicos. Los resultados mostraron diferencias importantes en la longitud del tallo, en las formas de entrenudo, yema, aurícula y lígula, así como en los grupos de pelos de la vaina. Estas variaciones se manifestaron en un estudio de ocho subclones de caña de azúcar obtenidos por métodos biotecnológicos de la variedad CP52-43. En este estudio se evaluaron 29 indicadores morfológicos, tales como: tallo, entrenudo, nudo, yema, hojas, lígula, aurícula, entre otros. Sin embargo, no describen la técnica que utilizaron para obtener los subclones de la variedad.

2.3 Caracterización molecular de la diversidad

Para detectar variabilidad genética en las plantas generadas por cultivo de tejidos se puede recurrir a marcadores morfológicos y marcadores moleculares. Éstos últimos aventajan a los morfológicos, puesto que no son afectados por el ambiente y el estado fisiológico de la planta evaluada, además de otros factores. Los marcadores moleculares constituyen una herramienta muy útil y precisa que puede ser utilizada para la evaluación de la diversidad genética en cultivo de tejidos. Esta técnica consiste en la utilización de un grupo de marcadores polimórficos en los diferentes subcultivos que se desean evaluar. A través de esto se generan una serie de bandas que son transformadas en una matriz binaria, donde 0 representa la ausencia de la banda y 1 la presencia de la banda. Las bandas que son comunes en todos los individuos se interpretan como similitudes genéticas, y las menos comunes, como diferencias genéticas. Posteriormente se genera una matriz de similitud (o distancia) y se efectúan análisis estadísticos para determinar los niveles de similitud entre los materiales en evaluación (Molina y Melgar, 2012; Quemé, Molina, Melgar y Ponciano, 2004).

En la actualidad los marcadores de ADN son los más utilizados, los cuales se obtienen por restricción de fragmentos o por amplificación de fragmentos, a través de la reacción en cadena a la polimerasa (PCR, en inglés). Roughan *et al.*, fueron los primeros en reportar el uso de marcadores moleculares en caña de azúcar, en un estudio que realizaron en el año 1971 (Molina y Melgar, 2012).

Para hacer una caracterización molecular en caña de azúcar se han utilizado diversas técnicas. Esto ha dado lugar a la elaboración de mapas genéticos de caña de azúcar, utilizando polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente (RAPD), marcadores de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), marcadores de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y marcadores microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR). Estos últimos son los marcadores más utilizados, y son un tipo de marcador genético, el cual se basa en la repetición de la misma secuencia una y otra vez y todas seguidas, de dos a muchos miles de veces de un elemento que mide de 1-6 nucleótidos. Estos marcadores son detectados a través de la amplificación de ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Molina y Melgar, 2012; Quemé *et al.*, 2004).

Maccheroni, Jordão, Degaspari y Matsuoka (2007) identificaron tres marcadores microsatélites (CV29, CV37 y CV38) para determinar índices de similitud genética entre variedades. Esto lo lograron en un estudio en donde evaluaron el desarrollo de un sistema de toma de huellas dactilares basado en microsatélites que resultara confiable para ser utilizado en caña de azúcar. Estos marcadores microsatélites fueron utilizados en un trabajo de caracterización de variedades en CENGICAÑA (Molina, Ávalos, Quemé y Maddaleno, 2014).

2.4 Caracterización morfológica de la diversidad

A nivel de campo también puede establecerse la variabilidad producida por cultivo de tejidos. Esto se realiza a través de la caracterización morfológica, la cual no es más que la descripción de la forma de los diversos órganos que componen una planta. Esta resulta de vital importancia debido a que nos es útil para diferenciar las distintas especies de caña de azúcar, así también para reconocer las diferentes variedades existentes de este cultivo. La acertada descripción de dichos órganos es esencial para la correcta tipificación de unas y otras (Gómez, 1983).

Una caracterización consiste en registrar los caracteres morfológicos y fenológicos que son altamente heredables, fácilmente visibles por el ojo y que se expresan en todos los ambientes. Estos caracteres no son influenciados por el ambiente, por lo que son de mucha utilidad para clasificar e identificar individuos en los que se busca conocer su similitud (Quemé, Orozco y Salazar, 2013).

Para la caracterización morfológica se toman en cuenta muchos órganos de la planta, siendo los más importantes el entrenudo, el nudo, la yema, el cuello, la aurícula y la lígula. Estos órganos se caracterizan mediante descriptores botánicos establecidos por investigadores que se dedicaron a la caracterización de la caña de azúcar (Amaya, Cock, del Pilar y Irvine, 1995; Gómez, 1983; Moore, 1987; MSIRI, 1990; Orozco y Soto, 1996; Sánchez, 1992).

Castro (2010) realizó una caracterización morfológica de variedades promisorias de caña de azúcar en la zona sur de Guatemala. La metodología que utilizó en la descripción morfológica se basó en la identificación de los caracteres morfológicos de la planta de acuerdo al descriptor botánico propuesto por Artschwager y Brandes en el año 1958 (Moore, 1987). En su estudio incluyó la variedad CG98-10, de la cual describió las principales características morfológicas, facilitando así la identificación de esta variedad.

2.4.1 El tallo

Comercialmente hablando, el tallo es el órgano de mayor importancia en la planta de caña de azúcar, puesto que este almacena todos los azúcares que posteriormente son extraídos para la preparación del azúcar comercial. Por otro lado, el tallo constituye la parte aérea de la planta y es quien le brinda sostén a las hojas. En cuanto a morfología, el tallo está formado por secciones denominadas entrenudos, los cuales están separados por los nudos (Amaya *et al.*, 1995; Gómez, 1983).

A. Entrenudo

El entrenudo constituye la porción de tallo que se encuentra entre dos nudos. La forma de los entrenudos varía con cada variedad, pero existen otras características que varían por condiciones climáticas y por manejo del cultivo, tal es el caso del diámetro, la longitud, el color, entre otras. Las formas de entrenudo más conocidas (figura 1) se describen a continuación (Gómez, 1983; Moore, 1987):

- **Cilíndrico:** se denomina así cuando el entrenudo tiene lados paralelos y conserva el diámetro y la forma en toda su longitud.
- **Abarrilado:** el entrenudo posee un mayor diámetro en la parte media, el cual disminuye en los extremos, lo cual le proporciona un aspecto en forma de barril.
- **Constreñido:** en este tipo de entrenudo, los extremos poseen mayor diámetro que el centro.
- **Conoidal:** en forma de cono, en donde el diámetro en la parte inferior del entrenudo es mayor que en la parte superior.
- **Obconoidal:** en forma de cono invertido. En este caso, el diámetro en la parte superior del entrenudo es mayor que en la parte inferior.
- **Curvo:** en este caso el entrenudo es levemente curvado, de tal manera que un lado es cóncavo y el otro convexo.

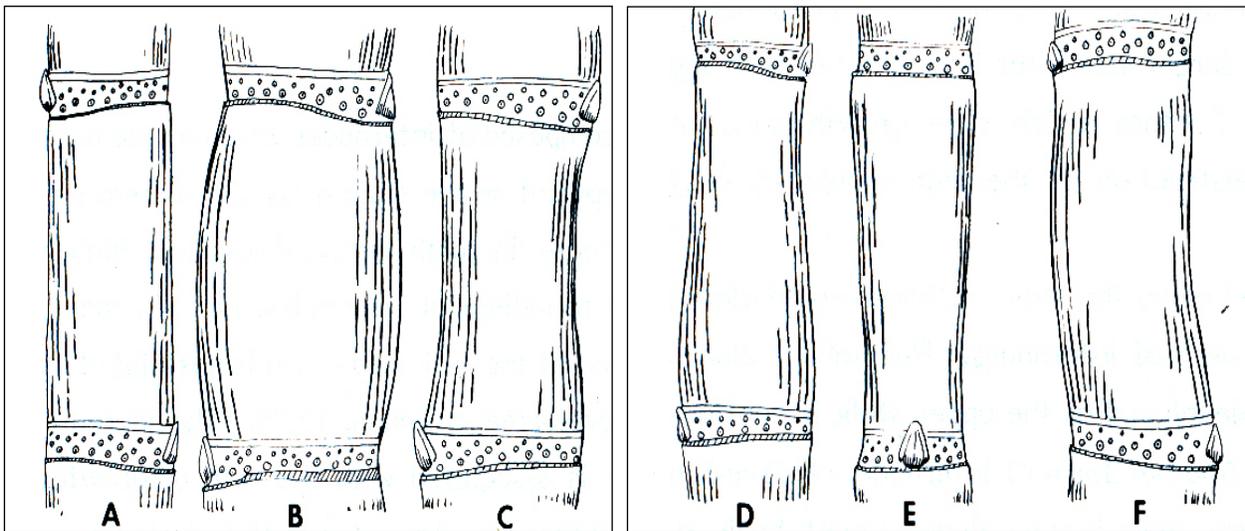


Figura 1. Formas de entrenudo: A, cilíndrico; B, abarrilado; C, constreñido; D, conoidal; E, obconoidal; y F, curvo.
Fuente: Moore (1987).

B. Nudo

Es la parte del tallo, en su conjunto general, más conocida por ser muy dura, fibrosa y por su poca o casi nula presencia de jugo. Alberga varios elementos de gran importancia anatómica y de gran valor taxonómico. El nudo constituye la separación entre dos entrenudos (Amaya *et al.*, 1995; Gómez, 1983). Artschwager y Brandes, en el año 1958, definieron las siguientes formas de nudos: cilíndrico, constreñido, conoidal y obconoidal (Moore, 1987). La figura 2 muestra los tipos de nudos más conocidos:

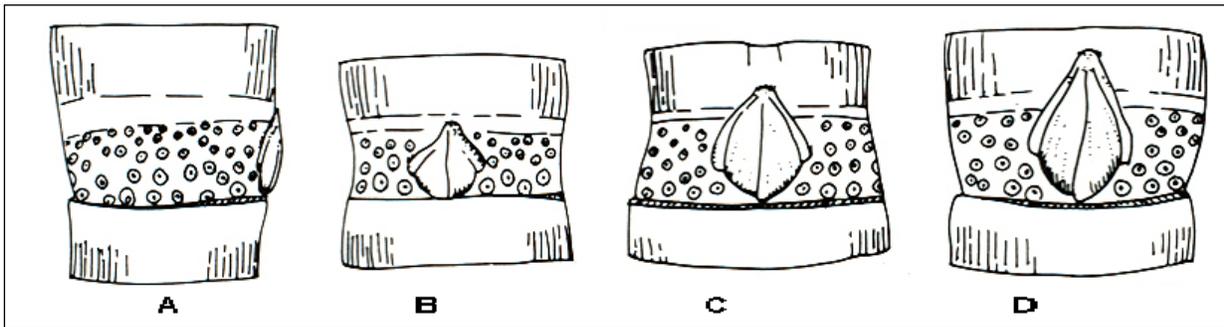


Figura 2. Formas de nudo: A, cilíndrico; B, constreñido; C, conoidal; D, obconoidal.

Fuente: Moore (1987).

B.1 Yema

Puede considerarse el órgano más importante de la semilla, puesto que tiene la capacidad de generar por crecimiento vegetativo a una planta semejante a la original. En condiciones normales se presenta una yema por cada nudo, dispuesta en forma alterna y generalmente protegida por la vaina. La yema se encuentra insertada en la banda radicular y en la parte superior de la cicatriz foliar. La forma de la yema varía en las variedades, por lo que constituye un elemento de importancia en la identificación de estas (Amaya *et al.*, 1995; Gómez, 1983; Moore, 1987; Sánchez, 1992). Los diferentes tipos de yemas se muestran en la figura 3.

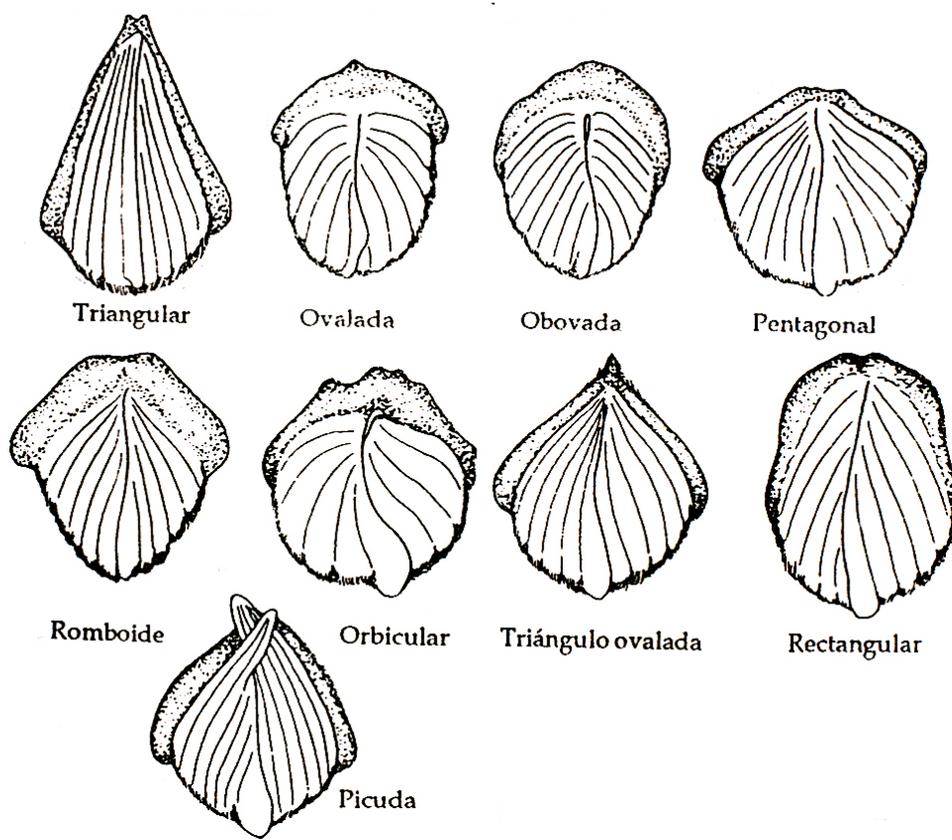


Figura 3. Formas de la yema.
Fuente: Sánchez (1992).

2.4.2 La hoja

Las hojas de la caña de azúcar son solitarias, alternas, dísticas, sésiles y ligeramente asimétricas sobre la nervadura central. Están colocadas más o menos en el mismo plano de adherencia al nudo, del cual se originan y se distribuyen en posiciones alternas a lo largo del tallo a medida que este crece (Amaya et al., 1995; Moore, 1987; Sánchez, 1992).

A. Cuello de la hoja

El cuello de la hoja constituye la unión entre la lámina foliar y la vaina foliar en sus extremos. La superficie exterior del cuello se encuentra formada por dos áreas generalmente triangulares que difieren de la lámina foliar en color y estructura interna (Moore, 1987; Orozco y Soto, 1996; Sánchez, 1992). Las formas más comunes de cuello de la hoja se muestran en la figura 4.

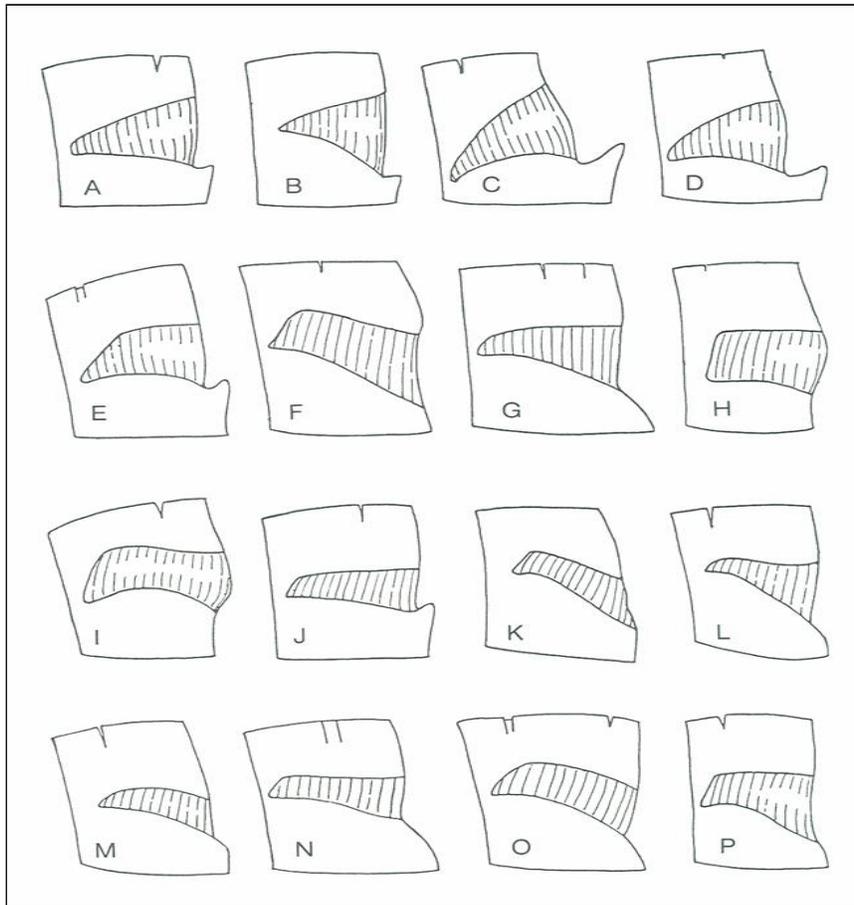


Figura 4. Tipos de cuello de la hoja: A, deltoide; B, deltoide acampanado; C, deltoide descendente; D, deltoide doble creciente; E, deltoide cuadrado; F, cuadrado ascendente; G, cuadrado subcreciente; H, cuadrado alto; I, cuadrado creciente; J, cuadrado estrecho; K, ligular ascendente; L, ligular acampanado; M, doble creciente estrecho; N, ligular estrecho; O, doble creciente ancho; P, cuadrado acampanado.

Fuente: MSIRI (1990).

B. Aurícula

Son apéndices en forma de orejas que están situados en la parte superior de la vaina. Pueden ser desde una, dos o ausentes y a veces muy poco desarrolladas. Todo esto depende de la variedad. Las aurículas son muy tomadas en cuenta para la caracterización, con base en su presencia, tamaño, forma y tipo de inserción en la vaina de la hoja (Gómez, 1983; Moore, 1987). Los tipos más comunes de aurículas se observan en la figura 5.

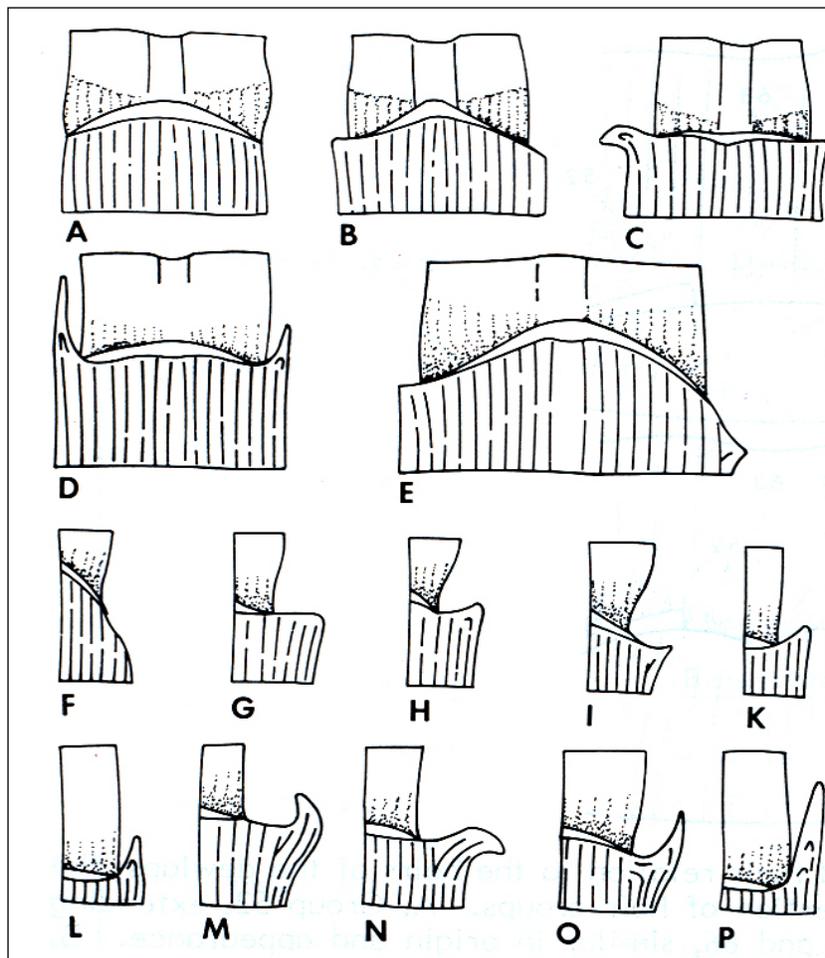


Figura 5. Tipos de aurículas: A, aurícula ausente; B, aurícula transicional; C, aurícula interior calcariforme; D, ambas aurículas lanceoladas; E, ambas aurículas transicional pero una transicional descendente; F, aurícula transicional inclinada; G, recta; H, transicional ascendente; I, dentada; K, deltoide; L, lanceolada corta; M, unciforme; N, calcariforme; O, falcata; P, lanceolada larga.

Fuente: Moore (1987).

C. Lígula

No es más que un apéndice membranoso, localizado en el punto interior de inserción de la lámina de la vaina. En términos generales puede considerarse como una pequeña prolongación libre de la vaina. Esta crece en la cara interna de la vaina y puede o no ser pubescente, es transparente cuando es tierna y descolorida o rasgada cuando madura y seca (Gómez, 1983; Moore, 1987; Sánchez, 1992). Los diferentes tipos de lígula se ilustran en la figura 6.

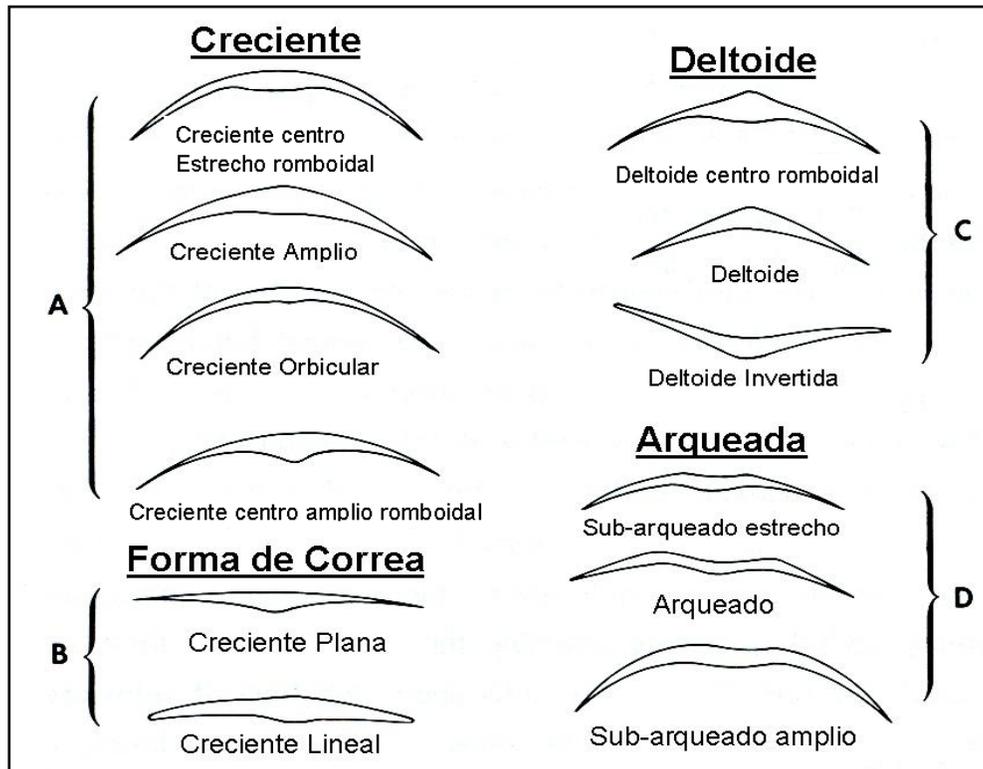


Figura 6. Formas de lígulas por grupos. A, Creciente; B, Forma de Correa; C, Deltoide; D, Arqueada.
Fuente: Moore (1987).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Planteamiento del problema y justificación de la investigación

Con fines de mejoramiento genético la variación somaclonal es benéfica porque crea variabilidad genética. No obstante, con fines de multiplicación de semilla la variación somaclonal es un problema, porque afecta la pureza genética y fenotípica de la semilla que se quiere multiplicar.

La premisa de esta investigación es que las plantas resultantes del proceso de multiplicación *in vitro* deben ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta madre. Algunas técnicas dan como resultado variación somaclonal en las plantas obtenidas, lo cual elimina por completo la posibilidad de mantener la pureza varietal. Cabe destacar que el grado de variación somaclonal difiere, de acuerdo a la variedad y protocolo que se utilice para la multiplicación *in vitro*.

Algunos ingenios de la agroindustria azucarera guatemalteca poseen laboratorios en donde efectúan cultivo de tejidos para la producción de semilla de caña de azúcar. Esto lo realizan con la finalidad de aumentar la tasa de multiplicación de semilla, obtener semilla libre de enfermedades y asegurar la pureza varietal.

En CENGICAÑA se efectúa multiplicación de plantas de caña de azúcar por cultivo de tejidos. Sin embargo, no existe información acerca del efecto de los subcultivos en este proceso. Ante esta situación se planteó esta investigación, con la cual se logró medir el efecto del número de subcultivos *in vitro* sobre la variación genética y fenotípica en caña de azúcar, en la variedad CG98-10.

La información generada será de utilidad en la toma de decisiones para la multiplicación *in vitro* de variedades de caña de azúcar, con la finalidad de que se produzcan plantas sin afectar la pureza genética del material multiplicado.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

- ✓ Determinar el efecto del cultivo *in vitro* sobre la variación genética y fenotípica en la variedad de caña de azúcar CG98-10, a través de la caracterización molecular y morfológica.

4.2 Específicos

- Determinar el efecto del número de subcultivos sobre la variación genética de plantas producidas *in vitro*, mediante el análisis de los patrones de bandas de ADN generados con marcadores moleculares.
- Determinar el efecto del número de subcultivos sobre las características fenotípicas de plantas producidas *in vitro*, a través de una caracterización morfológica.

V. HIPOTESIS

- Al menos uno de los subcultivos evaluados presentará variaciones genéticas en las plantas micropropagadas respecto al testigo absoluto.
- Al menos uno de los subcultivos evaluados presentará variaciones fenotípicas en las plantas micropropagadas, en comparación con el testigo absoluto.

VI. METODOLOGIA

6.1 Localización

El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), se encuentra localizado en la Finca Camantulul, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla, en el kilómetro 92.5 de la carretera CA-2 Occidente. Dista tres kilómetros de la cabecera municipal de Santa Lucía Cotzumalguapa, 37 kilómetros de la cabecera departamental de Escuintla y 92.5 kilómetros de la ciudad capital de Guatemala. Se encuentra en las coordenadas 14° 19' 30" latitud norte y 90° 03' 03" longitud oeste (Salazar, 2007). La presente investigación se realizó en el área experimental del Área de Fitomejoramiento y el laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA.

6.2 Material experimental

6.2.1 Plantas de caña de azúcar

En el estudio se utilizaron plantas de la variedad CG98-10, que es un híbrido del género *Saccharum* spp., descendiente del cruzamiento entre los progenitores PR87-2078 x PR87-2073, el cual fue hecho en la cuarta campaña de cruzamientos por el Programa de Variedades de CENGICAÑA, en la zafra de 1996-1997.



Figura 7. Variedad CG98-10.

Fuente: Orozco, Castro, Buc, Quemé y Ovalle (2009).

La razón de elegir esta variedad es debido a que es una variedad liberada por CENGICAÑA, sembrada en la zafra 2011-12 en un área de 10,882 hectáreas, que representó un 5.6% del área total cultivada, ubicándose en la primera posición entre las variedades guatemaltecas y en la cuarta posición en la composición varietal de la agroindustria azucarera (Orozco, 2012). En la zafra 2013-14 mantuvo esa misma posición, con un área de 11,225 hectáreas, lo cual representa un 5.8 % del área total cultivada (Orozco, Buc y Ovalle, 2013).

Además esta variedad posee muy buena respuesta de producción de plantas en cultivo *in vitro*, pues en un estudio realizado en CENGICAÑA se evaluaron diez variedades CG (CENGICAÑA-Guatemala) y la variedad CP72-2086, y los resultados mostraron que la variedad CG98-10 fue la que presentó el mayor número de plantas regeneradas por callo, en comparación con las otras variedades, y obtuvo hasta 10 veces más plantas por callo que la variedad CP72-2086, que actualmente ocupa el segundo lugar en la composición varietal de la agroindustria azucarera guatemalteca (Molina y Maddaleno, 2011).

6.3 Factor estudiado

6.3.1 Subcultivos *in vitro*.

El factor estudiado consistió en el número de subcultivos realizados en el laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA.

6.4 Descripción de los tratamientos

Se realizaron nueve subcultivos *in vitro*, muestreando los subcultivos 3, 6 y 9, los cuales pasaron a constituir tratamientos, por lo tanto, el estudio consideró estos tres tratamientos más el testigo absoluto que no fue multiplicado por la técnica de cultivo de tejidos (subcultivo 0). Cada uno de los cuatro tratamientos evaluados estuvo constituido por 16 macetas de cuatro plantas cada una. En total fueron sembradas 64 macetas por los cuatro tratamientos. Los tratamientos evaluados se describen en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos evaluados.

Identificación	Descripción
T1	Subcultivo 0 (Testigo absoluto)
T2	Subcultivo 3
T3	Subcultivo 6
T4	Subcultivo 9

6.5 Diseño experimental

Para la distribución de los tratamientos y manejo del experimento en el campo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones.

6.6 Modelo estadístico

El modelo correspondiente a un diseño completamente al azar no fue utilizado para el análisis en este estudio, debido a la naturaleza de las características morfológicas de las plantas, que fueron categóricas.

Por su parte, los patrones de banda de los tratamientos fueron evaluados mediante el modelo estadístico correspondiente al coeficiente de Dice, el cual se estima con la fórmula:

$$Sa,b = \frac{2N}{2N + na + nb}$$

Donde: **Sa,b** = Coeficiente de la similitud que existe entre los genotipos *a* y *b*; **N** = Total de coincidencia de bandas entre los genotipos *a* y *b*; **na** = Total de bandas presentes en el genotipo *a*; **nb** = Total de bandas presentes en el genotipo *b*

6.7 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por cuatro macetas, en las cuales se sembraron cuatro plantas por maceta, por lo tanto, cada tratamiento alojó 16 plantas. Las macetas estuvieron representadas por recipientes de 30 L de capacidad.

6.8 Croquis de campo

El croquis de campo con la distribución de los tratamientos se detalla en la figura 12 de los anexos.

6.9 Etapas y manejo del experimento

El estudio consideró varias etapas relacionadas con laboratorio y campo. Estas se detallan a continuación:

6.9.1 Multiplicación *in vitro*

Se produjeron plántulas a través del proceso de cultivo *in vitro*, provenientes de la variedad CG98-10, las cuales pasaron por los diferentes procedimientos de laboratorio descritos en la metodología por Molina, Sut y Maddaleno (2013). Se efectuaron un máximo de nueve subcultivos, de los cuales se evaluaron en el campo los subcultivos 3, 6 y 9. Un subcultivo consiste en transferir una cantidad de plantas producidas *in vitro*, de un cultivo previo a un nuevo medio de cultivo. La metodología de Molina *et al.* (2013) se describe en los siguientes subincisos.

6.9.1.1 Obtención de discos foliares a partir de ápices de tallo

El proceso de cultivo de tejidos se inició utilizando plantas de entre 4 – 8 meses de edad de la variedad CG98-10, previamente sembrada en un lote de la Estación Experimental de Camantulul-CENGICAÑA. Se cortaron ápices de tallos de aproximadamente 50 cm de longitud.

Luego, dentro del laboratorio, los ápices fueron preparados eliminando las hojas externas y cortando el tallo por debajo del meristemo apical hasta dejarlo de una longitud aproximada de 30 cm. Estos tallos fueron desinfectados superficialmente colocándolos durante 20 minutos dentro de una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 %, la cual se preparó a partir de cloro comercial (figura 8).



Figura 8. Desinfección superficial de ápices de caña de azúcar

Los ápices fueron trasladados a la cámara de flujo laminar, en donde fueron enjuagados tres veces con agua desmineralizada y esterilizada para eliminar el exceso de cloro. Posteriormente se eliminó una o dos hojas externas y se procedió a seccionar transversalmente el cilindro foliar interno en discos de aproximadamente 0.5 cm de diámetro (figura 9), los cuales fueron sembrados en los medios de cultivo (figura 10).



Figura 9. Corte del cilindro foliar para la obtención de discos foliares.

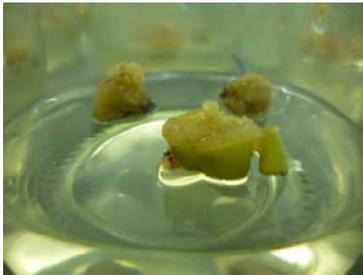


Figura 10. Siembra de discos foliares en medio de cultivo.

6.9.1.2 Inducción de callo

Las secciones transversales así obtenidas, fueron inducidas a formar callo en un medio MS suplementado con 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) + 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar.

6.9.1.3 Regeneración de plantas

Los explantes fueron incubados a 25°C en condiciones de oscuridad durante ocho días y luego un fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad. A los ocho días después de la siembra, todos los callos formados fueron trasladados a medio libre de 2,4-D. Los subcultivos de los brotes formados se realizaron cada 20 días, hasta obtener los nueve subcultivos.

Por su parte, el tratamiento 1 (testigo absoluto), no pasó por el proceso de cultivo de tejidos. Las plantas de este tratamiento se obtuvieron directamente de la germinación de yemas provenientes de esquejes de plantas de caña de azúcar, variedad CG98-10, con una edad comprendida entre los 6 – 8 meses.

Para ello fue necesario cortar esquejes de aproximadamente 50 cm de longitud, los cuales se seccionaron dejando únicamente trozos con yemas viables. Estas yemas se sembraron en bandejas multiceldas de 24 agujeros, las cuales previamente fueron preparadas con un sustrato a base de turba rubia de musgo *Sphagnum* canadiense.

6.9.2 Aclimatación

Esta fase se realizó luego de haber finalizado la etapa de producción de plantas *in vitro*. Esto con el objetivo de iniciar la adaptación de los materiales a condiciones de invernadero. En esta fase se trasladaron los materiales obtenidos de la multiplicación *in vitro* a bandejas multiceldas de 24 agujeros, preparadas con un sustrato a base de turba rubia de musgo *Sphagnum* canadiense. En esta fase se incluyó al testigo absoluto (tratamiento 1) que no pasó por el proceso de cultivo de tejidos (subcultivo 0). Por tratamiento se sembraron un total de 96 plantas en esta fase, es decir, cuatro bandejas multiceldas de 24 agujeros.

6.9.3 Trasplante

Cuando las plantas del proceso de aclimatación cumplieron dos meses de edad se procedió a trasplantarlas a macetas de 30 L de capacidad, preparadas con un sustrato de tierra y arena. En esta actividad se trasplantaron cuatro plantas por maceta y por cada tratamiento se tuvieron cuatro macetas en cada repetición (figura 12). En esta fase se efectuó la caracterización molecular y morfológica a los materiales.

6.9.4 Caracterización molecular

Tras ocho meses de haber trasladado los tratamientos a la fase de macetas, se procedió a la caracterización molecular siguiendo la metodología descrita por Molina *et al.* (2014). La metodología se resume en los siguientes subincisos.

6.9.4.1 Obtención de material vegetal

El material utilizado se obtuvo de los cuatro tratamientos establecidos en el experimento (subcultivos 0, 3, 6 y 9) de la variedad CG98-10, cuando las plantas tenían 10 meses de edad. De cada tratamiento se obtuvieron varios segmentos de hojas jóvenes con buen estado fitosanitario.

6.9.4.2 Extracción de ADN y procedimiento de PCR

Los segmentos de hoja joven recolectados fueron pulverizados con ayuda de nitrógeno líquido y a aproximadamente 150 mg de tejido se le agregaron 600 µl de buffer CTAB. Las muestras se incubaron a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregó 500 µl de Cloroformo:isopentanol 24:1, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos se retiraron 450 µl aproximadamente del sobrenadante a un tubo nuevo en el cual se le agrego 15 µl de ARNasa para luego ser encubado 15 minutos a 37°C, posteriormente se repitió el lavado con cloroformo:isopentanol para rescatar 400 µl a un tubo nuevo con 40 µl de acetato de amonio y 2.5 volúmenes de isopropanol, se centrifugó con las condiciones antes mencionadas y se retiró el sobrenadante, el precipitado se lavó con 350 µl de etanol al 70%, se dejó secar para luego ser resuspendido en 100 µl de buffer TE

La amplificación se llevó a cabo en 10 µl de reacción conteniendo 2 µl de ADN, 1.9 µl de 10x solución buffer con MgCl₂, 2 µl de dNTPs (2.5 µM), 0.5 µl de cada iniciador (10 µM), 0.3 µl de Taq ADN Polimerasa (5 U/µl) y 3 µl de agua desmineralizada.

El programa de PCR para la amplificación de fragmentos fue el siguiente: una desnaturalización inicial de cinco minutos a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 6 minutos.

Se utilizaron tres marcadores microsatélites (CV29, CV37 y CV38), tal como lo hicieron Maccheronni *et al.*, (2007).

Las secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de las secuencias simples son:

CV29 Forward 5'-TCGCGTCCACCAATGTAACC-3';

Reverse 5'-GCGTGCATCGCTTGTGTCTT-3'

CV37 Forward 5'-GGATGGACGACGTGTCCTGG-3':

Reverse 5'-ATAAAGTGGCCGCTTGGATTGA-3'

CV38 Forward 5'-GAAGCAGGGGCCTCAAGTTG-3':

Reverse 5'-GTCAAACAGGCGATCTGGCTC-3'

6.9.4.3 Electroforesis y visualización de los fragmentos

Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y visualizados mediante tinción con nitrato de plata. Se compararon cada uno de los tratamientos para establecer si existió variación en alguna de las bandas en cuanto a presencia o ausencia y determinar el grado de variabilidad genética producida por el proceso de cultivo de tejidos.

6.9.5 Caracterización morfológica

6.9.5.1 Elaboración de boletas

Se elaboraron boletas para la recolección de los datos de las características morfológicas de las plantas.

6.9.5.2 Recolección de caracteres morfológicos

Consistió en la recolección de información de características morfológicas a través de la observación de los órganos y estructuras de todas las plantas de cada uno de los tratamientos, anotando las características observadas en las boletas de recolección de datos. Todo esto cuando las plantas tenían una edad de nueve meses. Estas características se determinaron asociando lo observado con el descriptor botánico propuesto en el año 1958 por Artschwager y Brandes (Moore, 1987).

6.10 Variables de respuesta

6.10.1 Patrones de bandas de los tratamientos

Los datos generados por medio de la caracterización molecular se utilizaron para calcular la similitud genética entre los materiales evaluados, mediante el coeficiente de Dice, tal como lo hicieron Quemé *et al.* (2004). A través del coeficiente de similitud se calculó el coeficiente de distancia ($1 - S$).

6.10.2 Características morfológicas de las plantas

a. Características del tallo

- Entrenudo
- Nudo
- Yema

b. Características de la hoja

- Cuello de la hoja
- Aurícula
- Lígula

En el cuadro 2 se muestran las escalas utilizadas para la medición de las características morfológicas en las plantas.

Cuadro 2. Forma de medición de las características morfológicas de las plantas.

Características morfológicas de las plantas	Escala	Descripción de la escala
El tallo		
Entrenudo	1, 2, 3, 4, 5, 6	1 = cilíndrico; 2 = abarrilado; 3 = constreñido; 4 = conoidal; 5 = obconoidal; 6 = curvo.
Nudo	1, 2, 3, 4	1 = cilíndrico; 2 = constreñido; 3 = conoidal; 4 = obconoidal.
Yema	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1 = triangular; 2 = ovalada; 3 = obovada; 4 = pentagonal; 5 = romboide; 6 = orbicular; 7 = triángulo ovalada; 8 = rectangular; 9 = picuda.
La hoja		
Cuello de la hoja	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	1 = deltoide; 2 = deltoide acampanado; 3 = deltoide descendente; 4 = deltoide doble creciente; 5 = deltoide cuadrado; 6 = cuadrado ascendente; 7 = cuadrado subcreciente; 8 = cuadrado alto; 9 = cuadrado creciente; 10 = cuadrado estrecho; 11 = ligular ascendente; 12 = ligular acampanado; 13 = doble creciente estrecho; 14 = ligular estrecho; 15 = doble creciente ancho; 16 = cuadrado acampanado.
Aurícula	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	1 = ausente; 2 = transicional; 3 = interior calcariforme; 4 = ambas lanceoladas; 5 = ambas transicional pero una transicional descendente; 6 = transicional inclinada; 7 = recta; 8 = transicional ascendente; 9 = dentada; 10 = deltoide, 11 = lanceolada corta; 12 = unciforme; 13 = calcariforme; 14 = falcata; 15 = lanceolada larga.
Lígula	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	1 = creciente centro estrecho romboidal; 2 = creciente amplio; 3 = creciente orbicular; 4 = creciente centro amplio romboidal; 5 = creciente plana; 6 = creciente lineal; 7 = deltoide centro romboidal; 8 = deltoide; 9 = deltoide invertida; 10 = sub arqueado estrecho; 11 = arqueado; 12 = sub arqueado amplio.

Basado en los caracteres descritos en el año 1958 por Artschwager y Brandes (Moore, 1987).

6.11 Análisis de la información

6.11.1 Variación genética

6.11.1.1 Ordenamiento y tabulación

Luego de haber realizado la extracción de ADN, el procedimiento de PCR, la electroforesis y la visualización de los fragmentos, los patrones de bandas se codificaron en una matriz de presencia y ausencia. Esto con la finalidad de integrarlo al análisis de las variables correspondientes a esta investigación.

6.11.1.2 Matriz de resultados

La presencia de una banda en un tratamiento en particular se identificó con 1 y la ausencia como 0. De esta forma se construyó la matriz de unos y ceros que contiene toda la información de los tratamientos y sus repeticiones, además de contener la información que generaron los marcadores microsatélites CV29, CV37 y CV38.

6.11.1.3 Análisis estadístico

Los datos de la matriz de unos y ceros fueron utilizados para el análisis de la similitud genética entre los genotipos evaluados con el coeficiente de Dice, el cual se estima con la fórmula:

$$S_{a,b} = \frac{2N}{2N + n_a + n_b}$$

Donde: **S_{a,b}** = Coeficiente de la similitud que existe entre los genotipos *a* y *b*; **N** = Total de coincidencia de bandas entre los genotipos *a* y *b*; **n_a** = Total de bandas presentes en el genotipo *a*; **n_b** = Total de bandas presentes en el genotipo *b*

Habiendo obtenido los datos de similitud genética, se realizó el cálculo de las distancias entre tratamientos, mediante la utilización de la siguiente fórmula:

$$D_{a,b} = 1 - S$$

Donde: **D** = Distancia que existe entre los genotipos *a* y *b*; **S** = coeficiente de similitud de Dice.

Con esto se generó una matriz de distancias entre los cuatro tratamientos evaluados. Esta matriz fue interpretada gráficamente a través un método de agrupamiento jerárquico de tipo UPGMA (Unweighted Pair Group using Arithmetic Average). Estos análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico *InfoStat versión 2013* (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Gonzalez, Tablada y Robledo, 2013). Este software es un sistema de programas utilizado para realizar análisis estadísticos.

6.11.2 Variación fenotípica

6.11.2.1 Ordenamiento y tabulación

Luego de la recopilación de la información de las características morfológicas de las plantas se procedió a tabular y ordenar los datos. Posteriormente se realizó la comparación de las características observadas en las plantas que pasaron por el proceso de cultivo de tejidos con las plantas que no pasaron por este proceso.

6.11.2.2 Determinación de variaciones fenotípicas

Para ello se compararon las características presentadas por cada material con las características de la variedad original descritas por Castro (2010), para determinar si existen variaciones morfológicas. De esta manera se determinaron las variaciones que se produjeron durante el proceso de cultivo de tejidos sobre las características fenotípicas de las plantas.

6.11.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico consiste en utilizar métodos tabulares, cálculo de valores máximos, mínimos y medias. Primeramente se establecieron diferencias entre tratamientos para cada característica, en el caso de que existieran.

Debido a que las características morfológicas constituyeron variables categóricas y en el caso de esta investigación cada variable se midió a través de una escala no jerárquica, se planificó utilizar la Prueba de Fr de Friedman para establecer diferencias entre tratamientos en las variables evaluadas, tal como se describe en *InfoStat versión 2013* (Di Rienzo *et al.*, 2013).

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Caracterización molecular

7.1.1 Análisis de los marcadores moleculares

De los tres marcadores microsatélites utilizados, CV29 generó 10 bandas entre 44-375 pares de bases, seguido de CV37 con 12 bandas entre 123-1,165 pares de bases y por último CV38 con 10 bandas entre 112-296 pares de bases. Esto se describe en el cuadro 3.

Cuadro 3. Bandas amplificadas de microsatélites del estudio de comparación de subcultivos en caña de azúcar, variedad CG98-10.

Marcador Microsatélite	No. de bandas	No. promedio de bandas polimórficas	Pares de bases
CV29	10	5	44 – 375
CV37	12	2	123 – 1,165
CV38	10	2	112 – 296
Total	32	9	
Promedio	11	3	

En promedio se observaron 11 bandas por marcador, siendo el marcador con más bandas el CV37 con 12, y los marcadores CV29 y CV38 con 10 bandas. Sin embargo el marcador CV29 fue el que presentó el mayor número promedio de bandas polimórficas, cinco, en comparación con las dos que presentaron los otros marcadores. En cuanto a pares de bases, se observa también que el marcador CV37 fue el que amplificó mayor rango de pares de bases, con valores comprendidos entre 123 – 1165 pares de bases. Por su parte, el marcador CV38 mostró el menor rango, con 112 – 296 pares de bases.

Por el número de bandas y el número de pares de bases, se confirma la utilidad de estos marcadores moleculares para determinar similitud genética, tal como lo determinaron Maccheroni *et al.*, (2007).

7.1.2 Análisis de la matriz de distancias genéticas

De las 32 bandas obtenidas se generó la matriz de distancias genéticas, las cuales se muestran en el cuadro 4. De acuerdo a la matriz de coeficientes de distancias de Dice, los valores entre cada par de tratamientos osciló entre 0.02 y 0.10, con un promedio de 0.08. La presencia de

distancias mayores a cero indica la existencia de variación genética entre los tratamientos, en una escala euclidiana que va de 0 a 1, donde los valores cercanos a 1 indican alta variación y cercanos a 0, poca variación.

En el cuadro 4 se observan los coeficientes de distancia ($1 - S$) de los cuatro tratamientos que fueron evaluados en la investigación. Al comparar cada tratamiento con subcultivo con el testigo, se observa que existe distancia genética, aunque sea baja.

Cuadro 4. Matriz de coeficientes de distancia ($1 - S$) de los tratamientos evaluados.

	Testigo	Subcultivo 3	Subcultivo 6	Subcultivo 9
Testigo	0.00			
Subcultivo 3	0.06	0.00		
Subcultivo 6	0.07	0.02	0.00	
Subcultivo 9	0.10	0.10	0.10	0.00

Se encontró que cuando se realizaron tres subcultivos, existió una variación de 0.06 (6 %) con relación al testigo que no fue propagado por la técnica de cultivo *in vitro*. Esta variación se incrementó a 0.07 (7 %) cuando en la variedad se realizaron seis subcultivos. Por último, cuando se realizaron nueve subcultivos, se obtuvo una variación genética de 0.10 (10 %). Por tanto, existe una secuencia lógica entre el incremento del número de subcultivos *in vitro* en la variedad CG98-10 y el incremento de la variación genética.

Por otra parte, estos resultados indican que el subcultivo 3 y el subcultivo 6 poseen la menor distancia genética, con un 0.02 (2 %), lo que significa que existe un 98 % de similitud entre ellos. El subcultivo 9 manifestó una distancia de 0.10 con los restantes tratamientos. Es decir, que al realizar 9 subcultivos *in vitro* en la variedad CG98-10, existirá un 10 % de variación respecto al resto de tratamientos. Estos resultados son exclusivamente aplicables para esta variedad, bajo las condiciones y los procedimientos aplicados en el laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA.

7.1.3 Análisis gráfico de las distancias genéticas

A partir de la matriz de coeficientes de distancias de Dice ($1 - S$) de los tratamientos evaluados se elaboró un dendrograma que muestra las relaciones de distancia genética entre los

tratamientos (figura 11). En el dendrograma se muestra que los tratamientos fueron agrupados en tres grupos.

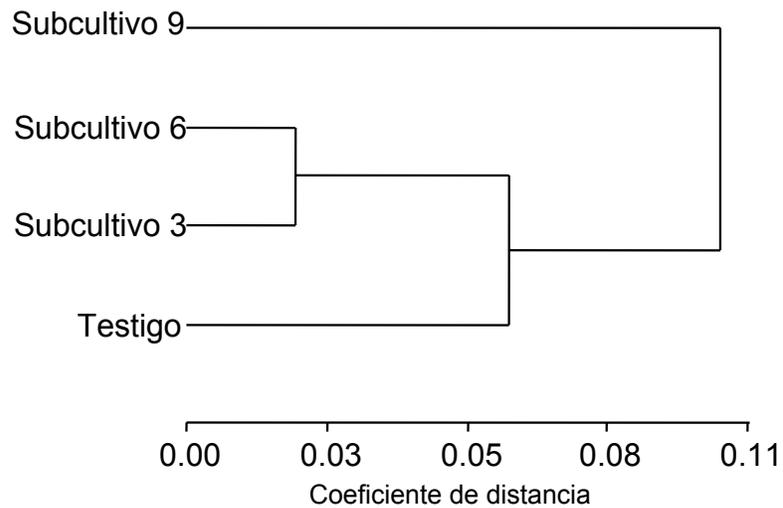


Figura 11. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre los tratamientos evaluados, obtenido con el método de agrupamiento jerárquico UPGMA.

En la figura 11 se pueden observar las distancias genéticas generadas entre los tratamientos evaluados, a partir del coeficiente de distancia. Esta figura muestra que en un grupo fue agrupado solamente el testigo; en un segundo grupo los subcultivos 3 y 6 y en el tercer grupo el subcultivo 9.

Además, se observa que los subcultivos 3 y 6 difieren en 0.02, es decir, tienen una similitud genética de 98 % entre ellos, mientras que con el testigo difieren en 0.06. Por último, el subcultivo 9 difiere de todos los demás en 0.10, lo que confirma que mientras se aumenta el número de subcultivos, también aumenta la diversidad entre plantas.

Con estos resultados, no se rechaza la hipótesis que dice que al menos uno de los subcultivos evaluados presentará variaciones genéticas en las plantas micropropagadas respecto al testigo absoluto.

7.2 Caracterización morfológica

En el cuadro 5 se muestran las características morfológicas de los tratamientos evaluados en la investigación. Se observa que todas las características evaluadas fueron totalmente idénticas en los cuatro tratamientos. Esto indica que para las características evaluadas no existió ninguna diferencia morfológica causada por el número de subcultivos *in vitro*.

El análisis no paramétrico planificado para las características morfológicas no se realizó, puesto que no hubo variación entre tratamientos. La identificación de los caracteres morfológicos del testigo se basó en los resultados que obtuvo Castro, quien en el año 2010 realizó la caracterización morfológica de variedades promisorias de caña de azúcar de Guatemala. En esta caracterización incluyó la variedad CG98-10 y describió todas sus características morfológicas, las cuales no variaron con los resultados del presente estudio.

En esta investigación se compararon los resultados obtenidos por Castro (2010) con los que manifestaron los tratamientos evaluados. Luego de analizar la descripción morfológica de los tratamientos, es evidente que todos los tratamientos muestran las mismas características morfológicas y, efectivamente, que no hubo variación fenotípica alguna en los materiales.

Con base en las características morfológicas consideradas en este estudio se puede decir que la multiplicación *in vitro* hasta un número máximo de 9 subcultivos no afectan fenotípicamente a la variedad CG98-10. Con estos resultados se rechaza la hipótesis que dice que al menos uno de los subcultivos evaluados presentará variaciones fenotípicas en las plantas micropropagadas, en comparación con el testigo absoluto.

Considerando las características genéticas y fenotípicas, se puede decir que no hay variación fenotípica, pero si hay variación genética. Esto puede explicarse porque los marcadores microsatélites solamente amplifican en ciertas regiones del genoma de la caña de azúcar. Entonces es probable que las características morfológicas evaluadas no se encuentren en ninguna de estas regiones que los marcadores amplificaron, o que los cambios genéticos producidos se dieron en regiones no codificantes del genoma de la caña de azúcar.

Cuadro 5. Descripción de las características morfológicas de los tratamientos.

Característica	Tratamiento	Escala	Descripción	Figura
Entrenudo	Testigo	1	Cilíndrico	
	Subcultivo 3	1		
	Subcultivo 6	1		
	Subcultivo 9	1		
Nudo	Testigo	3	Conoidal	
	Subcultivo 3	3		
	Subcultivo 6	3		
	Subcultivo 9	3		
Yema	Testigo	7	Triángulo ovalada	
	Subcultivo 3	7		
	Subcultivo 6	7		
	Subcultivo 9	7		
Cuello	Testigo	4	Deltoide doble creciente	
	Subcultivo 3	4		
	Subcultivo 6	4		
	Subcultivo 9	4		
Aurícula 1	Testigo	8	Transicional ascendente	
	Subcultivo 3	8		
	Subcultivo 6	8		
	Subcultivo 9	8		
Aurícula 2	Testigo	11	Lanceolada corta	
	Subcultivo 3	11		
	Subcultivo 6	11		
	Subcultivo 9	11		
Lígula	Testigo	7	Deltoide centro romboidal	
	Subcultivo 3	7		
	Subcultivo 6	7		
	Subcultivo 9	7		

VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Al multiplicar la variedad CG98-10 a través de cultivo de tejidos existe un efecto sobre la variación genética de las plantas producidas *in vitro*. Esto se logró determinar a través del análisis de los patrones de bandas de ADN, los cuales fueron generados con los marcadores microsatélites CV29, CV37 y CV38. La distancia muestra un comportamiento ascendente, es decir, conforme se incrementa el número de subcultivos en la variedad CG98-10, aumenta el coeficiente de distancia genética. Los valores van de 0.06 (subcultivo 3), 0.07 (subcultivo 6) y 0.10 (subcultivo 9) con respecto al testigo absoluto.

- ✓ El análisis de las características fenotípicas de las plantas de la variedad CG98-10 producidas *in vitro* muestra que no existe ningún efecto para las seis características consideradas, ocasionado por el incremento en el número de subcultivos. Entonces pueden realizarse hasta nueve subcultivos en la variedad CG98-10, y no se manifestarán variantes en las seis características fenotípicas de los materiales obtenidos.

IX. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda evaluar otras variedades de importancia para la agroindustria azucarera guatemalteca, para determinar si son afectadas fenotípica y genotípicamente por el incremento en el número de subcultivos *in vitro*.
- ✓ Para que los datos de esta investigación sean validados, se recomienda que cuando se multipliquen plantas por cultivo *in vitro*, se realice el análisis molecular a los materiales resultantes de los subcultivos. Esto con la finalidad de disponer de suficiente información que pueda medir la efectividad del cultivo *in vitro* en cuanto a pureza genética.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acevedo R., R., Campo Z., R., Casas G., M. A., Cornide H., M. T., Cortezaga A., L., Coto A., O., *et al.* (2002). Normas y procedimientos del programa de mejoramiento genético de la caña de azúcar en Cuba. H. Jorge S., R. González H., M. A. Casas G., I. Jorge G. (eds.). *Boletín No. 1 Cuba y Caña*. Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. La Habana, Cuba. 244-279 pp.
- Amaya E., A., Cock, J. H., del Pilar H., A. y Irvine, J. E. (1995). Biología. En: *El cultivo de la Caña en la zona Azucarera de Colombia*. Cassalet D., C., Torres A., J. S. y Isaacs E., C. H. (eds.) Cali, Colombia. 31-62 pp.
- Arribas M., J. (1997). *Propagación invitro de tres variedades de caña de azúcar (Saccharum sp.), a partir de apéndices en medio líquido*. Tesis. Biólogo. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 39 p.
- ASAZGUA – Asociación de Azucareros de Guatemala. (2015). Economía. Consultado el 14 de enero de 2015. Disponible en: <http://www.azucar.com.gt/economia.html>
- Castro G., O. L. (2010). *Caracterización morfológica, maduración natural y productividad de variedades promisorias de caña de azúcar (Saccharum spp: Poaceae) en la zona sur de Guatemala*. Tesis. Ingeniero Agrónomo. Universidad Rafael Landívar. Escuintla, Guatemala. 50 p.
- Del Toro M., F., Martin F., D, Saucedo C., O. y Linacero F., E. (1991). Descripción de subclones de caña de azúcar obtenidos por cultivos de tejidos. *Centro Azúcar, La Habana*, 16(2), 73-82.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2013) *InfoStat versión 2013*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- 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.
- Gómez A., F. (1983). Morfología, Anatomía y Sistemática. En: *Caña de Azúcar*. 2da. Edición. Venezuela. 661 p.
- López, E., Ovalle, W., Orozco, H. y Quemé, J. L. (2003). Micropropagación de variedades promisorias de caña de azúcar. En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2002-2003*. CENGICAÑA. Guatemala. 81-84 pp.
- Maccheroni, W., Jordao, H., Degaspari, R. y Matsuoka, S. (2007). Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* (26):889-900.
- Molina, L., Ávalos, A., Quemé, J. L. y Maddaleno, C. (2014). Caracterización molecular de 43 variedades de caña de azúcar mediante marcadores microsatélite. En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2013-2014*. CENGICAÑA. Guatemala. 198-202 pp. Disponible en:
<http://www.cengicana.org/publicaciones/memorias/memorias/Memoria-Presentaci%C3%B3n-de-Resultados-de-Investigaci%C3%B3n-2013-2014/es/publicaciones/memorias/memorias/Memoria-Presentaci%C3%B3n-de-Resultados-de-Investgaci%C3%B3n-2013-2014/2.-Variedades/Caracterizaci%C3%B3n-Molecular-de-43-Variedades-de-Ca%C3%B1a-de-Az%C3%BAcar/> (recuperado el 25-09-2014).
- Molina, L. y Maddaleno, C. (2011). Medición del efecto de tres compuestos químicos sobre la oxidación de explantes y regeneración de plantas por cultivo de tejidos en 11 variedades de caña de azúcar. En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2010-2011*. CENGICAÑA. Guatemala. 132-139 pp.
- Molina, L. y Melgar, M. (2012). Biotecnología aplicada al cultivo de caña de azúcar. En: *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Melgar, M., Meneses, A., Orozco, H., Pérez, O. y Espinosa, R. (eds.). Editorial Artemis Edinter. Guatemala. 512 p.

- Molina, L., Sut, V. y Maddaleno, C. (2013). Evaluación de factores que afectan la regeneración *in vitro* de plantas en variedades guatemaltecas de caña de azúcar (híbridos *Saccharum* spp.) En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2012-2013*. CENGICAÑA. Guatemala. 152-168 pp. Disponible en:
<http://cengicana.org/es/publicaciones/memorias/memorias/Memoria-Presentaci%C3%B3n-de-Resultados-de-Investigaci%C3%B3n-2012-2013/2--Variedades/Biotecnolog%C3%ADa/Evaluaci%C3%B3n-de-Factores-que-Afectan-la-Regeneraci%C3%B3n-In-Vitro-de-Plantas-en-Variedades-Guatemaltecas-de-Ca%C3%B1a-de-Az%C3%BAcar-%28H%C3%8DBRIDOS--Saccharum-SPP.%29/> (recuperado el 15-01-2014).
- Moore, P. H. (1987). Anatomy and Morphology. En: *Sugarcane Improvement through Breeding*. Heinz, D. J. (ed.) Amsterdam, The Netherlands. 603 p.
- MSIRI – Mauritius Sugar Industry Research Institute. (1990). Notes on description of varieties. En: *Sugarcane Varieties in Mauritius. A botanical description*. Réduit, Mauritius. 94 p.
- Navarro U., S. y Vera E., R. (1991). Historia del cultivo de tejidos vegetales. En: *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Hurtado M., D. V. y Merino M., M. E. (eds.). Editorial Trillas. 2da. Reimpresión. México. 232 p.
- Oropeza, M., Guevara, P., de García, E. y Ramírez, J. L. (1995). Identification of somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum* spp.) resistant to sugarcane mosaic virus via RAPD markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 13 (2), 182-191.
- Orozco V., H. (2012). Censo de variedades de caña de azúcar en Guatemala, zafra 2012-2013. En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2011-2012*. CENGICAÑA. Guatemala. 73-86 pp. Disponible en: <http://www.cengicana.org/es/publicaciones/memorias/memorias/2011-2012/Variedades/Censo-de-Variedades-de-Ca%C3%B1a-de-z%C3%BAcar-en-Guatemala--Zafra-2012-2013./> (recuperado el 18-10-2012).
- Orozco V., H., Buc A., R. y Ovalle S., W. (2013). Censo de variedades de caña de azúcar en Guatemala, zafra 2013-2014. En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación*.

Zafra 2012-2013. CENGICAÑA. Guatemala. 36-48 pp. Disponible en: <http://cengicana.org/es/publicaciones/memorias/memorias/Memoria-Presentaci%C3%B3n-e-Resultados-de-Investigaci%C3%B3n-2012-2013/2--Variedades/Variedades/Censo-de-Variedades-de-Ca%C3%B1a-de-Az%C3%BAcar-en-Guatemala-Zafra-2013-2014/> (recuperado el 14-01-2014).

Orozco V., H., Castro G., O., Buc, R., Quemé de L., J. y Ovalle S., W. (1999). Variedad CG98-10. En: *Nuevo catálogo de variedades promisorias de caña de azúcar para la Agroindustria Azucarera Guatemalteca*. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, CENGICAÑA. Guatemala. 1 disco compacto 8mm.

Orozco, H. y Soto, G. (1996). Morfología de las variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp*) importantes en Guatemala y de variedades en evaluación regional grupo CGVO. *Documento Técnico No. 7*. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Escuintla, Guatemala. 43 p.

Pérez P., J. (1991). Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (eds.) Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970 p.

Quemé, J. L. (2012). Cultivo de tejidos en caña de azúcar (comunicación personal). Guatemala, Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA).

Quemé, J. L., Molina, L., Melgar, M. y Ponciano, K. (2004). Análisis de la similitud genética de 48 variedades de caña de azúcar utilizando secuencias de Microsatélites de ADN. En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2003-2004*. CENGICAÑA. Guatemala. 67-71 pp.

Quemé, J. L., Orozco, H. y Salazar, A. (2013). Evaluación de la colección de germoplasma de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) de CENGICAÑA en dos ambientes de la zona cañera de Guatemala. En: *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2012-2013*. CENGICAÑA. Guatemala. 122-129 pp. Disponible en: <http://cengicana.org/es/publicaciones/memorias/memorias/Memoria-Presentaci%C3%B3n->

de-Resultados-de-Investigaci%3%B3n-2012-2013/2--
Variedades/Variedades/Evaluaci%3%B3n-de-la-Colecci%3%B3n-de-Germoplasma-de-
Ca%3%B1a-de-Az%3%BAcar-%28Saccharum-SPP.%29--de-Cengica%3%B1a-en-
dos-Ambientes-de-la-Zona-Ca%3%B1era-de-Guatemala/ (recuperado el 19 de septiembre
de 2014)

Salazar O., A. O. (2007). Informe final de actividades agrícolas desarrolladas en el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), Finca Camantulul, municipio de Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. Informe de Prácticas Perito Agrónomo. Escuela de Formación Agrícola –EFA– de San Marcos. Guatemala. 89 p.

Sánchez N., F. (1992). Caña de azúcar. Morfología y anatomía de la caña. En: *Materia Prima: Caña de Azúcar*. Editorial del Manual Azucarero, S.A. de C.V. 2da. Edición. México. 789 p.

XI. ANEXOS

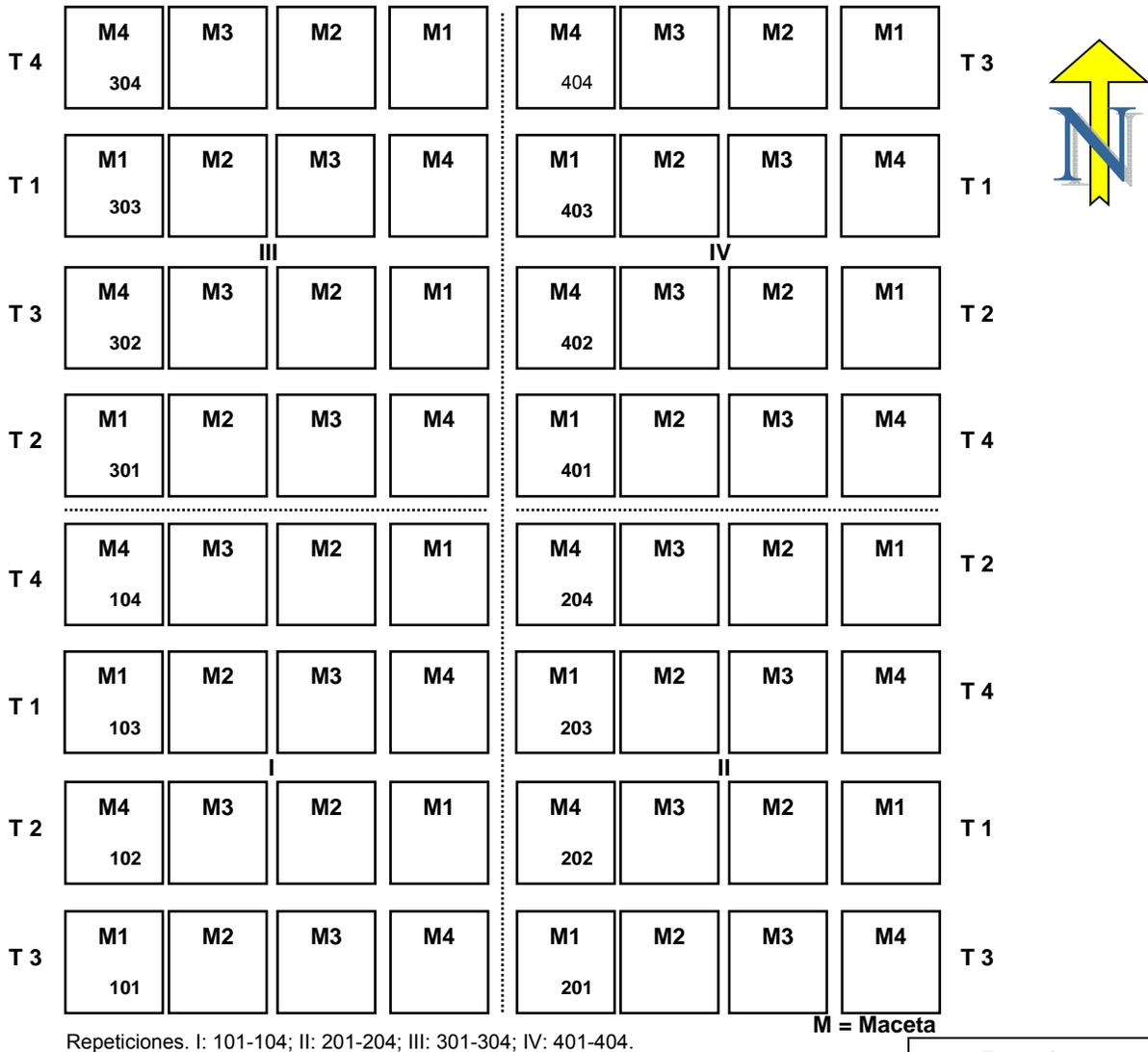


Figura 12. Croquis de campo.

Tratamientos	
T 1	Subcultivo 0
T 2	Subcultivo 3
T 3	Subcultivo 6
T 4	Subcultivo 9

Cuadro 6. Matriz binaria de datos generados por los marcadores microsatélites.

Marcador	Repetición	No. Banda	T1	T2	T3	T4
CV29	1	1	1	1	1	1
CV29	1	2	1	1	1	1
CV29	1	3	0	1	1	0
CV29	1	4	1	1	1	1
CV29	1	5	1	1	1	1
CV29	1	6	1	1	1	1
CV29	1	7	1	1	1	1
CV29	1	8	1	1	1	1
CV29	1	9	0	1	1	0
CV29	1	10	1	1	1	0
CV37	1	11	1	1	1	1
CV37	1	12	1	1	1	1
CV37	1	13	1	1	1	1
CV37	1	14	1	1	1	1
CV37	1	15	1	1	1	1
CV37	1	16	1	1	1	1
CV37	1	17	1	1	1	1
CV37	1	18	1	1	1	1
CV37	1	19	1	1	1	1
CV37	1	20	1	1	1	1
CV37	1	21	1	1	1	1
CV37	1	22	1	1	1	1
CV38	1	23	1	1	1	1
CV38	1	24	0	0	0	1
CV38	1	25	1	1	1	1
CV38	1	26	1	1	1	1
CV38	1	27	1	1	1	1
CV38	1	28	1	1	1	1
CV38	1	29	1	1	1	1
CV38	1	30	1	1	1	1
CV38	1	31	1	1	1	1
CV38	1	32	1	1	1	1
CV29	2	1	0	1	1	1
CV29	2	2	0	1	1	0
CV29	2	3	0	1	1	0
CV29	2	4	0	1	1	1
CV29	2	5	0	1	1	1
CV29	2	6	0	1	1	1
CV29	2	7	0	1	1	1

Marcador	Repetición	No. Banda	T1	T2	T3	T4
CV29	2	8	0	1	1	0
CV29	2	9	0	0	0	1
CV29	2	10	1	1	1	1
CV37	2	11	1	1	1	0
CV37	2	12	1	1	1	0
CV37	2	13	1	1	1	1
CV37	2	14	1	1	1	1
CV37	2	15	1	1	1	1
CV37	2	16	1	1	1	1
CV37	2	17	1	1	1	0
CV37	2	18	1	1	1	1
CV37	2	19	1	1	1	0
CV37	2	20	1	1	1	0
CV37	2	21	1	1	1	0
CV37	2	22	1	1	1	1
CV38	2	23	1	1	1	0
CV38	2	24	0	0	0	1
CV38	2	25	1	1	1	1
CV38	2	26	1	1	1	1
CV38	2	27	1	1	1	1
CV38	2	28	1	1	1	1
CV38	2	29	1	1	1	1
CV38	2	30	1	1	1	1
CV38	2	31	1	1	1	1
CV38	2	32	1	1	1	1
CV29	3	1	1	0	0	0
CV29	3	2	1	1	1	1
CV29	3	3	1	1	0	1
CV29	3	4	1	1	0	1
CV29	3	5	1	1	0	1
CV29	3	6	1	1	1	1
CV29	3	7	1	1	1	0
CV29	3	8	1	1	1	1
CV29	3	9	1	0	0	0
CV29	3	10	1	1	0	0
CV37	3	11	1	1	1	1
CV37	3	12	1	1	1	1
CV37	3	13	1	1	1	1
CV37	3	14	1	1	1	1
CV37	3	15	1	1	1	1

Marcador	Repetición	No. Banda	T1	T2	T3	T4
CV37	3	16	1	1	1	1
CV37	3	17	1	1	1	1
CV37	3	18	1	1	1	1
CV37	3	19	1	1	1	1
CV37	3	20	1	1	1	1
CV37	3	21	1	1	1	1
CV37	3	22	1	1	1	1
CV38	3	23	1	1	1	1
CV38	3	24	1	1	1	1
CV38	3	25	1	1	1	0
CV38	3	26	1	1	1	1
CV38	3	27	1	1	1	1
CV38	3	28	1	1	1	0
CV38	3	29	1	1	1	0
CV38	3	30	1	1	1	1
CV38	3	31	1	1	1	1
CV38	3	32	1	1	1	1
CV29	4	1	1	1	1	1
CV29	4	2	1	1	1	1
CV29	4	3	1	1	1	1
CV29	4	4	1	1	1	1
CV29	4	5	1	1	1	1
CV29	4	6	1	1	1	1
CV29	4	7	1	1	1	1
CV29	4	8	1	1	1	1
CV29	4	9	1	1	1	1
CV29	4	10	1	1	1	1
CV37	4	11	1	1	1	1
CV37	4	12	1	1	1	1
CV37	4	13	1	1	1	1
CV37	4	14	1	1	1	1
CV37	4	15	1	1	1	1
CV37	4	16	1	1	1	1
CV37	4	17	1	1	1	1
CV37	4	18	1	1	1	1
CV37	4	19	1	1	1	1
CV37	4	20	1	1	1	1
CV37	4	21	1	1	1	1
CV37	4	22	1	1	1	1
CV38	4	23	1	1	1	1

Marcador	Repetición	No. Banda	T1	T2	T3	T4
CV38	4	24	1	1	1	1
CV38	4	25	1	1	1	1
CV38	4	26	1	1	0	0
CV38	4	27	1	1	1	1
CV38	4	28	1	1	1	1
CV38	4	29	1	1	1	1
CV38	4	30	1	1	1	1
CV38	4	31	1	1	1	1
CV38	4	32	1	1	1	1

Cuadro 7. Características morfológicas de los individuos evaluados.

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
I	101	3	1	1	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		2	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		3	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		4	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3	2	1	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		2	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		3	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		4	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3	3	1	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		2	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		3	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		4	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3	4	1	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		2	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		3	1	3	7	4	8	11	7
I	101	3		4	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2	1	1	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		2	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		3	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		4	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2	2	1	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		2	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		3	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		4	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2	3	1	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		2	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		3	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		4	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2	4	1	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		2	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		3	1	3	7	4	8	11	7
I	102	2		4	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1	1	1	1	3	7	4	8	11	7

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
I	103	1		2	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		3	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		4	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		2	1	1	3	7	4	8	11
I	103	1	2		1	3	7	4	8	11	7
I	103	1	3		1	3	7	4	8	11	7
I	103	1	4		1	3	7	4	8	11	7
I	103	1	3	1	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		2	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		3	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		4	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1	4	1	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		2	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		3	1	3	7	4	8	11	7
I	103	1		4	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4	1	1	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		2	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		3	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		4	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4	2	1	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		2	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		3	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		4	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4	3	1	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		2	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		3	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		4	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4	4	1	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		2	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		3	1	3	7	4	8	11	7
I	104	4		4	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3	1	1	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		2	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		3	1	3	7	4	8	11	7

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
II	201	3		4	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3	2	1	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		2	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		3	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		4	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3	3	1	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		2	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		3	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		4	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3	4	1	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		2	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		3	1	3	7	4	8	11	7
II	201	3		4	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1	1	1	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		2	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		3	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		4	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1	2	1	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		2	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		3	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		4	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1	3	1	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		2	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		3	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		4	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1	4	1	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		2	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		3	1	3	7	4	8	11	7
II	202	1		4	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4	1	1	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		2	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		3	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		4	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4	2	1	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		2	1	3	7	4	8	11	7

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
II	203	4		3	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		4	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4	3	1	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		2	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		3	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		4	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		4	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4	4	1	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		2	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		3	1	3	7	4	8	11	7
II	203	4		4	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2	1	1	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		2	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		3	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		4	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2	2	1	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		2	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		3	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		4	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2	3	1	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		2	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		3	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		4	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2	4	1	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		2	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		3	1	3	7	4	8	11	7
II	204	2		4	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2	1	1	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		2	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		3	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		4	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2	2	1	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		2	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		3	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		4	1	3	7	4	8	11	7

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
III	301	2	3	1	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		2	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		3	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		4	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2	4	1	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		2	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		3	1	3	7	4	8	11	7
III	301	2		4	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3	1	1	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		2	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		3	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		4	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3	2	1	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		2	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		3	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		4	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3	3	1	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		2	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		3	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		4	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3	4	1	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		2	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		3	1	3	7	4	8	11	7
III	302	3		4	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1	1	1	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		2	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		3	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		4	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1	2	1	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		2	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		3	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		4	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1	3	1	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		2	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		3	1	3	7	4	8	11	7

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
III	303	1		4	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1	4	1	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		2	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		3	1	3	7	4	8	11	7
III	303	1		4	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4	1	1	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		2	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		3	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		4	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4	2	1	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		2	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		3	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		4	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4	3	1	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		2	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		3	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		4	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4	4	1	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		2	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		3	1	3	7	4	8	11	7
III	304	4		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4	1	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4	2	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4	3	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4	4	1	1	3	7	4	8	11	7

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
IV	401	4		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	401	4		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2	1	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2	2	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2	3	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2	4	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	402	2		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1	1	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1	2	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1	3	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1	4	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	403	1		4	1	3	7	4	8	11	7

Rep.	No. Parc.	No. Trat.	No. Maceta	No. Tallo	Características del tallo			Características de la hoja			
					Entrenudo	Nudo	Yema	Cuello	Aurícula 1	Aurícula 2	Lígula
IV	404	3	1	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3	2	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3	3	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		4	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3	4	1	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		2	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		3	1	3	7	4	8	11	7
IV	404	3		4	1	3	7	4	8	11	7