

**UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR**  
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS  
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA

MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE MERISTEMOS PARA CONTROL DEL VIRUS DEL  
AMARILLAMIENTO FOLIAR (SCYLV) EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR  
SISTEMATIZACIÓN DE PRÁCTICA PROFESIONAL

**MÓNICA MARÍA BOLAÑOS CAMPOLLO**  
CARNET 10309-12

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, JULIO DE 2017  
CAMPUS CENTRAL

**UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR**

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA

MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE MERISTEMOS PARA CONTROL DEL VIRUS DEL  
AMARILLAMIENTO FOLIAR (SCYLV) EN VARIETADES DE CAÑA DE AZÚCAR  
SISTEMATIZACIÓN DE PRÁCTICA PROFESIONAL

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

POR  
**MÓNICA MARÍA BOLAÑOS CAMPOLLO**

PREVIO A CONFERÍRSELE

EL TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA EN EL GRADO  
ACADÉMICO DE LICENCIADA

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, JULIO DE 2017  
CAMPUS CENTRAL

## **AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR**

RECTOR: P. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR, S. J.  
VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO  
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO  
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  
SECRETARIO: MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA  
DIRECTOR DE CARRERA: MGTR. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN

## **NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**

ING. HARRY FLORENCIO DE MATA MENDIZABAL

## **TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN**

MGTR. ANA SILVIA MARTINEZ RODAS  
MGTR. JOSÉ MANUEL BENAVENTE MEJÍA  
MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

Guatemala 13 de julio de 2017

Consejo de Facultad  
Ciencias Ambientales y Agrícolas  
Presente

Estimados miembros del Consejo:

Por este medio hago constar que he asesorado el trabajo de graduación del estudiante Mónica María Bolaños Campollo, carné 1030912, titulada: "MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE MERISTEMOS PARA CONTROL DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO FOLIAR (SCYLV) EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR".

La cual considero que cumple con los requisitos establecidos por facultad, previo a su autorización de impresión.

Atentamente,



Ing. Harry De Mata  
Asesor



**Universidad  
Rafael Landívar**  
Tradición Jesuita en Guatemala

**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS  
No. 06758-2017**

### **Orden de Impresión**

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Sistematización de Práctica Profesional de la estudiante MÓNICA MARÍA BOLAÑOS CAMPOLLO, Carnet 10309-12 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA, del Campus Central, que consta en el Acta No. 06106-2017 de fecha 29 de junio de 2017, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

**MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE MERISTEMOS PARA CONTROL DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO FOLIAR (SCYLV) EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR**

Previo a conferírsele el título de INGENIERA AGRÓNOMA CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA en el grado académico de LICENCIADA.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 12 días del mes de julio del año 2017.



**MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA, SECRETARIO  
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS  
Universidad Rafael Landívar**

## **AGRADECIMIENTOS**

A:

Dios que me da la vida y la bendición de superarme.

Ing. Harry Florencio de Mata Mendizabal, por su apoyo, revisión y corrección del presente trabajo.

La Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas por formar parte de mi desarrollo profesional.

Doctor Luis Molina, por su apoyo durante la realización de la práctica profesional.

Centro Guatemalteco de Investigación Capacitación de la Caña de Azúcar, por brindarme la oportunidad para realizar la práctica profesional.

## DEDICATORIA

A:

Dios, Quien con su amor me bendice infinitamente y me da la sabiduría para poder cumplir cada meta que me propongo.

Mis padres, Rafael Bolaños y Mónica Campollo, por su amor, su tiempo, darme formación en todos los ámbitos y ser un gran ejemplo a seguir.

Mi hermana, Marcela, por su amor, apoyo y motivación constante de superación.

Mi novio, Luis Ramírez, por su amor, consejos y apoyo constante.

Mi familia y amigos, por su amor incondicional y motivación constante.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
2.1.1. Generalidades de la caña de azúcar .....	3
2.1.2. Importancia mundial de la caña de azúcar .....	3
2.1.3. Importancia en Guatemala .....	4
2.1.4. Propagación .....	5
2.1.5. Variedades de caña de azúcar en Guatemala.....	5
2.1.6. Generalidades de la biotecnología agrícola.....	6
2.1.7. Cultivo de Tejidos .....	6
2.1.8. Medios de cultivo .....	7
2.1.9. Micropropagación .....	8
2.1.10. Cultivo de meristemas y saneamiento .....	9
2.1.11. Cultivo de discos y saneamiento .....	12
2.1.12. Diagnóstico de enfermedades mediante Marcadores Moleculares .....	14
2.1.13. Generalidades del Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV) .....	15
2.1.14. Síntomas .....	15
2.1.15. Métodos de Control .....	17
2.1.16. Transmisión y diseminación .....	17
2.2. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA INSTITUCION ANFITRIONA .....	17
2.3. Localización.....	17
2.3.1. Historia .....	17
2.3.2. Organización .....	18
3. CONTEXTO DE LA PRÁCTICA.....	20
3.1. NECESIDAD EMPRESARIAL Y EJE DE SISTEMATIZACIÓN .....	20
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. GENERAL .....	22
4.2. ESPECÍFICOS .....	22
5. PLAN DE TRABAJO .....	23
5.1. PROGRAMA DESARROLLADO EN CULTIVO DE MERISTEMOS.....	23
5.1.1. Traslado de variedades .....	23
5.1.2. Yemas sembradas.....	24



5.1.3. Meristemas apicales extraídos y sembrados .....	26
5.1.4. Meristemas desarrollados y multiplicados .....	30
5.1.5. Tejido tomado para diagnóstico.....	31
5.1.6. ARN extraído .....	32
5.1.7. Diagnóstico realizado con PCR y electroforesis en gel de Agarosa .....	35
5.1.8. Enraizado de plántulas obtenidas.....	36
5.2. PROGRAMA DESARROLLADO EN EL CULTIVO DE DISCOS.....	36
5.2.1. Traslado de variedades .....	37
5.2.2. Cogollos limpiados y discos sembrados .....	37
5.2.3. Discos sembrados en nuevo medio.....	40
5.2.4. Tejido tomado para diagnóstico.....	41
5.2.5. ARN extraído .....	42
5.2.6. Diagnóstico realizado con PCR y electroforesis en gel de Agarosa .....	45
5.2.7. Enraizado de plántulas obtenidas.....	46
5.3. INDICADORES DE RESULTADO.....	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
6.1. Meristemas.....	47
6.2. Discos.....	52
7. CONCLUSIONES .....	56
8. RECOMENDACIONES .....	58
9. BIBLIOGRAFÍA .....	59
10. ANEXO .....	63
10.1. Anexo 1 .....	63
10.2. Anexo 2 .....	69
10.2.1. Cultivo de meristemas .....	69
10.2.2. Cultivo de discos .....	72

## **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro 1. Variedades extranjeras que presentaron el SCYLV y que necesitaban sanearse a través del cultivo de meristemas. ....	24
Cuadro 2. Variedades utilizadas para el cultivo de discos.....	37
Cuadro 3. Componentes del Loading die .....	63

Cuadro 4. Componentes del medio Murashige y Skoog (1962) para 1 litro .....	63
Cuadro 5. Componentes del Tampón de Lavado. ....	63
Cuadro 6. Componentes del Tampón de Extracción .....	64
Cuadro 7. Componentes del Fenol: Cloroformo: Isopentanol. ....	64
Cuadro 8. Componentes de la escalera para el Virus del Amarillamiento Foliar. ....	64
Cuadro 9. Condiciones de PCR (Promega, 2017). ....	64
Cuadro 10. Premezcla de PCR utilizado para el SCYLV con el kit PROMEGA en las 8 muestras de los meristemos (Promega, 2017). ....	65
Cuadro 11. Premezcla de PCR utilizado para el SCYLV con el kit PROMEGA en las 10 muestras de los discos foliares (Promega, 2017). ....	65
Cuadro 12. Meristemos sembrados en las diferentes fechas. ....	66
Cuadro 13. Comparación del total de meristemos desarrollados con éxito con el cultivo de meristemos. ....	67
Cuadro 14. Número de frascos de discos foliares sembrados. ....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción Mundial de caña de Azúcar (FAOSTAT, 2015). ....	4
Figura 2. Estructura de la yema terminal (Campbell y Reece, 2007). ....	10
Figura 3. Embriogénesis somática a partir de discos de caña de azúcar (Molina y Melgar, 2014). ....	12
Figura 4. Amarillamiento intenso en la nervadura de la hoja (CENICAÑA, 2016). ....	16
Figura 5. La hoja superior se encuentra sana y las otras dos, manifiestan diferente intensidad de síntoma (Ovalle, 2014). ....	16
Figura 6. Organigrama de la empresa CENGICAÑA (CENGICAÑA, 2016). ....	19
Figura 7. Organigrama del área de sistematización de práctica. ....	20
Figura 8. Invernadero donde se obtuvieron las variedades extranjeras. ....	23
Figura 9. Bandejas donde fueron colocadas las yemas para su germinación, junto con el papel mayordomo humedecido. ....	25
Figura 10. Bandejas donde germinaron las yemas. ....	26
Figura 11. Yemas que germinaron dentro de las bandejas. ....	26
Figura 12. Los brotes fueron cortados con el bisturí para extraerlos. ....	28

Figura 13. Erlenmeyer donde se realizó el lavado de los brotes con cloro al 2.5%.....	28
Figura 14. Vista del brote diseccionado hasta el meristemo apical. ....	29
Figura 15. Meristemo extraído, visto desde el estereoscopio.....	29
Figura 16. Meristemos colocados en iluminación. ....	30
Figura 17. Meristemos colocados en medio MS sólido en frascos. ....	31
Figura 18. Meristemo cortado para muestra y colocado en medio líquido con 3mg de IBA. .....	32
Figura 19. Pulverización de la muestra con nitrógeno líquido. ....	34
Figura 20. Detalle de la muestra pulverizada con nitrógeno líquido. ....	35
Figura 21. Limpieza de cogollos en la probeta con cloro al 2.5%.....	39
Figura 22. Discos foliares sembrados en cajas petri. ....	39
Figura 23. Discos trasladados al medio de formación de discos. ....	40
Figura 24. Frascos colocados en el cuarto de incubación. ....	41
Figura 25. brotes donde se tomó la muestra de tejido vegetal. ....	41
Figura 26. Fase acuosa transferida en el paso 6.....	44
Figura 27. Centrifugadora utilizada a 13,000rpm.....	44
Figura 28. Meristemo no desarrollado en el medio de cultivo.....	48
Figura 29. Meristemo contaminado con hongo.....	48
Figura 30. Contaminación del meristemo por bacteria. ....	49
Figura 31. Muerte del meristemo por oxidación la octava semana después de siembra. .....	50
Figura 32. Gel resultado de la electroforesis, donde se observan las 8 muestras libres de virus (de izquierda a derecha). En la última muestra se encuentra el control del virus SCYLV.....	51
Figura 33. Discos con brotes y raíces formadas por medio de la embriogénesis somática. .....	53
Figura 34. Discos oxidados de la variedad B90-1227. ....	53
Figura 35. Gel resultado de la electroforesis en gel de agarosa, donde la séptima muestra (de izquierda a derecha) es positiva en la presencia del virus. El control es la undécima muestra donde la banda indicadora mide 219pb para SCYLV. ....	55
Figura 36. Meristemos colocados en iluminación en el cuarto de incubación. ....	69

Figura 37. Brote obtenido del meristemo sembrado de la variedad CP14-2265, a las 18 semanas después de siembra.....	69
Figura 38. Brote desarrollado a partir del meristemo a través de la organogénesis directa a las 18 semanas después de siembra. ....	70
Figura 39. Meristemos cambiados a medio MS con 3mg de IBA a las 12 semanas después de siembra. ....	70
Figura 40. Brote obtenido a partir de meristemo, a las 12 semanas después de siembra. ....	71
Figura 41. Brote obtenido a partir de la organogénesis directa a las 12 semanas después de siembra.....	71
Figura 42. Discos foliares a las 2 semanas después de siembra en frascos con medio MS. ....	72
Figura 43. Plántulas obtenidas a partir de la embriogénesis somática. Desarrollo a las 13 semanas después de siembra.....	72
Figura 44. Pellet de ARN obtenido a partir de la extracción de ARN.....	73

# **MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE MERISTEMOS PARA CONTROL DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO FOLIAR (SCYLV) EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR**

## **RESUMEN**

La práctica se realizó con el objetivo de sanear variedades de caña de azúcar infectadas con el virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV), por medio del cultivo de meristemos (organogénesis directa) y discos foliares (embriogénesis somática); llevada a cabo en CENGICAÑA. La evaluación del saneamiento se realizó con el uso de marcadores moleculares por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y la electroforesis en gel de agarosa. En la práctica se encontró que el cultivo de meristemos es 100% efectivo para el saneamiento del SCYLV, mientras que el cultivo de discos foliares obtuvo el 90% de saneamiento. La diferencia se debe a la capacidad de los meristemos de mantenerse en división celular, lo que permite que se encuentre libre de virus, mientras que los discos foliares no tienen conexión vascular de la planta donde fueron extraídos, sin embargo, no siempre se encuentran libres del virus. Respecto al éxito en la cantidad de plántulas obtenidas, a partir del cultivo de meristemos se tuvo el 10% de éxito y para discos foliares fue del 66.66%, lo cual pudo ser influenciado por factores como el genotipo de la planta; las condiciones de cultivo; los reguladores del crecimiento del medio y el estado fisiológico del explante. Uno de los problemas en la práctica fue la oxidación, por lo que se recomienda realizar ensayos de medios de cultivo con antioxidantes para disminuir la oxidación, que es la principal causa de muerte en el cultivo *in vitro* de meristemos y discos foliares.

## ***IN VITRO* PROPAGATION OF MERISTEM FOR CONTROL OF SUGARCANE YELLOW LEAF VIRUS (SCYLV) IN VARIETIES OF SUGARCANE**

### **SUMMARY**

The objective of the practice was to sanitize Sugarcane varieties infected with “Sugarcane Yellow Leaf Virus” (SCYLV) by meristem culture (direct organogenesis) and leaf disc (somatic embryogenesis) culture in CENGICAÑA. The evaluation of the sanitization was done by molecular markers in Polymerase Chain Reaction and Agarose Gel Electrophoresis. Results showed that meristem culture is 100% successful for the sanitization of SCYLV, while in leaf disc culture is 90% successful. The difference was caused by the meristem capacity of being in constant cellular division, which keeps it Virus-free, while leaf discs don't have vascular connection from the mother plant but aren't always virus-free. About success in the quantity of plants obtained, from meristem culture was 10% and for leaf disc culture was 66.66%, which could be influenced by factors as the genotype of the plant; growing conditions; growth regulators in the medium and the physiological age of the explant. One of the problems in this practice was the oxidation, therefore is recommended to do essays in mediums with antioxidants in order to minimize the oxidation which is the main cause of death in meristem and leaf disc culture.

# 1. INTRODUCCIÓN

El sector de la agroindustria azucarera a nivel mundial está conformado por grandes países productores de azúcar, con los cuales compete Guatemala posicionándose a nivel latinoamericano como uno de los principales países productores de la región. Para poder competir en un mercado tan exigente, se debe estar en constante desarrollo de investigación, así como la implementación de tecnologías con el fin de poder mantener altos rendimientos del cultivo y lograr una actividad altamente productiva (ASAZGUA, 2012).

Actualmente es un sector importante para la economía guatemalteca, representando el 31% del valor total de la exportación agrícola nacional y el 3% del PIB. Debido a su importancia, la Asociación de Azucareros de Guatemala (ASAZGUA) creó el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), organización responsable de generar, adaptar y transferir tecnología de calidad para el desarrollo rentable y sostenible de la agroindustria azucarera (ASAZGUA, 2012).

En el área de Biotecnología de CENGICAÑA, se generan nuevas variedades que respondan a las necesidades actuales del sector azucarero como el alto rendimiento, la resistencia a enfermedades y plagas, la resistencia a condiciones ambientales adversas, entre otras (Molina y Melgar, 2014). Entre los principales problemas, se encuentra el Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV) que presenta infecciones en casi el cien por ciento de las variedades que se utilizan en Guatemala (Ovalle, 2014).

Ante esta problemática, se necesita obtener plántulas libres del virus como parte del programa de variedades, por lo que en esta práctica se realizó el saneamiento de variedades infectadas con SCYLV a través del cultivo *in vitro* de meristemas, con la organogénesis directa, y discos foliares, con la embriogénesis somática. Posteriormente, se evaluó la presencia de la enfermedad por medio del análisis con marcadores moleculares.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### 2.1.1. Generalidades de la caña de azúcar

Se encuentra en la siguiente clasificación taxonómica: (Tropicos, 2016)

Clase: Equisetópsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Liliae

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Saccharum* L.

Especies: *Saccharum officinarum* L.

La caña de azúcar es una gramínea tropical, en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa, el cual es un compuesto que, al ser extraído y cristalizado en un proceso industrial, se forma el azúcar. La sacarosa es sintetizada por la caña a partir de la energía proveniente del sol durante la fotosíntesis. Presenta un metabolismo fotosintético del tipo C<sub>4</sub>, el cual le permite mantener altas tasas de crecimiento en condiciones de elevadas temperaturas ambientales (Osorio, 2007).

#### 2.1.2. Importancia mundial de la caña de azúcar

En la producción mundial, la caña de azúcar es el primer producto entre los edulcorantes. Se distribuye la tasa de crecimiento de producción, del periodo de 2000-2013, por región en: Europa -25%, África 0.69%, Asia 2.35%, América 5.10%. Para el 2014, el principal país productor de caña de Azúcar fue Brasil con el 39.38% de la producción, seguido de India con 18.18%, China con 6.72%, Tailandia con 5.33%, Pakistán con 3.40% y México con 3.26%. El restante 23.73% de la producción corresponde a 94 países del resto del mundo (figura 1) (FAOSTAT, 2015).



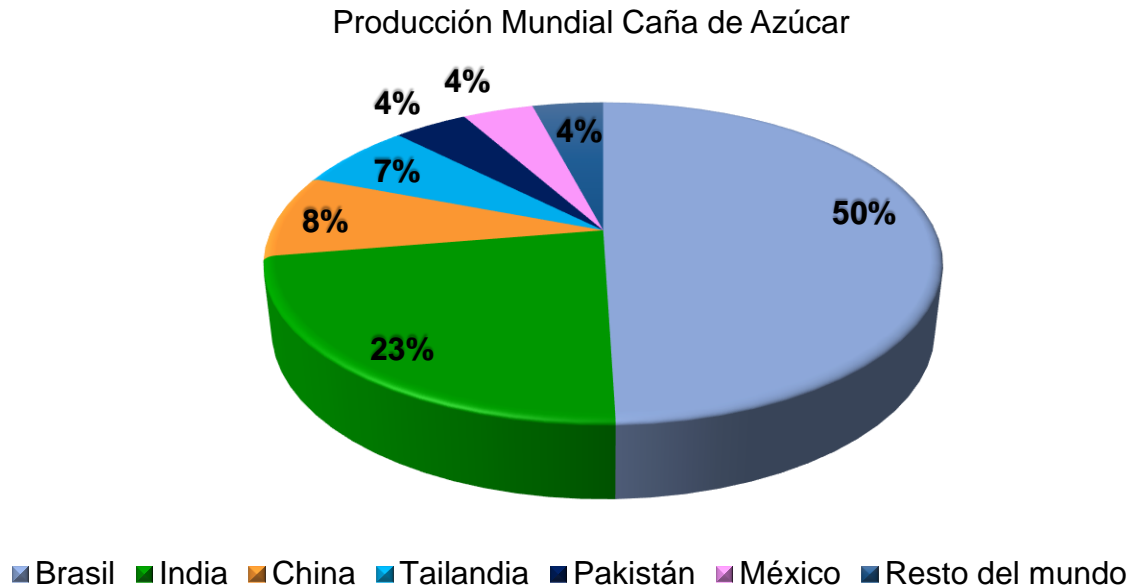


Figura 1. Producción Mundial de caña de Azúcar (FAOSTAT, 2015).

### 2.1.3. Importancia en Guatemala

En Guatemala, los primeros trapiches se fundaron en el valle central de Guatemala y en Salamá, en el siglo XVI. Durante el siglo XVII creció el número de trapiches y es hasta mediados del siglo XIX que se empezó a exportar azúcar en cantidades menores. En 1960 la producción total de azúcar de Guatemala fue de 68,000 Toneladas métricas. Luego de ese año, comenzó una era industrial mundial donde se desarrolló la modernización y crecimiento de los ingenios azucareros y en Guatemala se transformó de una industrial local a una industria de exportación y una de las actividades agroindustriales más importantes del país (Melgar, 2014).

A nivel de América Latina y El Caribe, Guatemala es el segundo exportador y el cuarto productor. A nivel mundial, ocupa el puesto cuarto como exportador y el tercero como productor por hectárea. El principal destino de la producción nacional es Estados Unidos, seguido de Chile, Canadá, México y otros (ASAZGUA, 2014). En cuanto al territorio cultivado se encuentran 235,000 ha con caña de azúcar, que equivale al 2.15% del territorio del país y el 7.85% del área cultivable del país. Dicha producción está distribuida

de la siguiente forma: Escuintla (88%), Suchitepéquez (8%), Santa Rosa (2%) y Retalhuleu (2%) (MAGA, 2014).

La agroindustria azucarera representa el 31% del valor total de la exportación agrícola guatemalteca y el 15.36% de las exportaciones totales del país. Así mismo, es el sector económico que más divisas genera. En 2013 produjo un ingreso de US\$978.1 millones el azúcar y la melaza. Además, la agroindustria azucarera representa alrededor del 3% del PIB nacional, donde genera 425,000 empleos directos e indirectos, de los cuales 32,000 corresponden a cortadores de caña (ASAZGUA, 2012).

En los otros usos que tiene el proceso de la caña de azúcar, es la cogeneración de energía eléctrica gracias al aprovechamiento del bagazo, con lo que se cogenera el 25% de energía eléctrica en época de zafra dentro del Sistema Nacional Interconectado (SIN), lo cual representa 480MW de potencia instalada. Así mismo, a partir de las mieles que son subproducto en la elaboración de azúcar, se produce alcohol. En la actualidad cinco empresas en donde participan algunos ingenios, realizan este proceso alcanzando una producción de 269 millones de litros al año, producto que es exportado a Europa y Estados Unidos (ASAZGUA, 2012).

#### **2.1.4. Propagación**

La simiente únicamente se utiliza para la multiplicación en los procesos de mejora genética. La propagación normalmente es vegetativa, a base de trozos de aproximadamente 30-50cm de longitud, pelados, con tres o más nudos, cada uno con sus yemas de crecimiento (Osorio, 2007).

#### **2.1.5. Variedades de caña de azúcar en Guatemala**

Durante el periodo de 1990 a 2010, en las variedades utilizadas en la Agroindustria Azucarera guatemalteca predominaron las “CP”, provenientes de la Estación Experimental de Canal Point (Florida, Estados Unidos). Entre estas, destaca la variedad CP72-2086 que en la zafra 2002/2003, ocupó el 75% del área sembrada. Dicha variedad ha sido denominada “supervariada” ya que ha ocupado más del 40% del área sembrada

y por un período de más de 10 años, con rendimientos de más de 8 toneladas de azúcar por hectárea (Melgar, 2014).

Otras variedades sembradas a partir de 2007 son MEX, CC, BR, SP, entre otras. Durante el periodo de 1990 a 2010 se inició el proceso de hibridación para el desarrollo de variedades guatemaltecas “CG” (CENGICANÑA, Guatemala), las cuales para la zafra 2010/2011 ocuparon 9,000 ha (Melgar, 2014).

#### **2.1.6. Generalidades de la biotecnología agrícola**

Existen diversas definiciones del término “biotecnología” pero se destaca el concepto de la Convención sobre la Diversidad Biológica (CBD) donde 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”. Por su parte, la biotecnología agrícola moderna comprende numerosos instrumentos que emplean los científicos con el fin de comprender y manipular la estructura genética de organismos que han de ser utilizados para la producción o elaboración de productos agrícolas.

En este ámbito, la biotecnología se utiliza para resolver problemas respecto a la producción y elaboración agrícola, incluyendo el fitomejoramiento para elevar el rendimiento, mejorar la resistencia a plagas, mejorar la resistencia a condiciones abióticas adversas, así como el aumento del contenido nutricional de los alimentos. De igual forma, se utiliza con el fin de crear material de plantación de bajo coste y libre de enfermedades, además de proporcionar nuevos instrumentos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de las plantas y para la medición y conservación de recursos genéticos (FAO, 2004).

#### **2.1.7. Cultivo de Tejidos**

El cultivo de tejidos se puede definir 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 (Levitus, et al., 2010). El cultivo *in vitro* de tejidos se ha usado para recuperar material de interés libre de patógenos en líneas infectadas (Castañeda, et.al., 2014).

### **2.1.8. Medios de cultivo**

Se define como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Generalmente comprenden de entre 6 a 40 compuestos. Básicamente, se componen de compuestos que suministran (Mroginski, Sansberro y Flaschland, 2010):

- Una fuente de carbono: la sacarosa es la fuente más común, en concentraciones de 2 al 5%. En algunos medios se reemplaza por glucosa.
- Nutrientes minerales: es el suministro de macro (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) que son esenciales para el crecimiento de las plantas. Se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. Es fundamental que el hierro también sea incorporado.
- Sustancias vitamínicas: la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen funcionamiento de los cultivos.
- Sustancias reguladoras del crecimiento: en los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos, se utilizan auxinas (2,4-D, AIA, NOA, AIB, entre otros) y/o citocininas (BAP, KIN, ZEA).
- Agente gelificante (en medios semisólidos): se adiciona agar (entre 0.6-1%). También se puede emplear Agar (0.40-0.60%), Phytigel (0.25-0.40%) y agarosa (0.80-0.90%) (Mroginski, Sansberro y Flaschland, 2010).

Entre las hormonas más utilizadas en el cultivo de tejidos *in vitro*, se encuentran las siguientes:

- 6-Bencilaminopurina (BAP): es una citocinina sintética que se utiliza en concentraciones de 0.1 a 1mg/L. Su función es promover la división celular, la inducción de yemas adventicias en callos e inducir la formación de brotes, también promueve la proliferación de tallos axilares debido a que incide en la ruptura de la dominancia apical (Quintanilla citado por Sánchez, 2009). BAP solo o combinado,

ofrece un efecto inhibitorio en la elongación de la raíz (Collie y Kerbauy citado por Condemarín, Chico y Vargas, 2007)

- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): es una auxina muy estable que muestra fuerte resistencia a la degradación y conjugación enzimática en células vegetales. Es necesaria para inducir divisiones mitóticas y alargamiento celular durante la fase de inducción de callo. Se debe eliminar del medio de cultivo cuando han ocurrido dichas divisiones celulares para que pueda dar lugar a la embriogénesis (Alvez y Oropeza, 2015). Específicamente en la caña de azúcar, la 2,4-D induce la embriogénesis somática (Ho y Vasil citado por Alvez y Oropeza, 2015).
- Ácido Indolbutírico (IBA): es uno de los reguladores más utilizados para la formación de raíces ya que es una auxina que no causa efectos fitotóxicos ni inhibe el crecimiento caulinar, siendo la auxina de mayor uso para dicha función. Es activo pese a que se metaboliza con rapidez a IBA-aspartato, la formación de este conjugado permite que el IBA se almacene y se libere gradualmente, manteniendo niveles adecuados de concentración (Condemarín, Chico y Vargas, 2007).

### **2.1.9. Micropropagación**

Con esta técnica se puede obtener, mediante la reproducción asexual, un gran número de plántulas a partir de una única planta. Las plántulas resultantes, son idénticas a la planta madre por lo que se pueden llamar “clones”. Para esto, se puede utilizar bulbos, rizomas, tubérculos, tallos, raíces, hojas, entre otras partes vegetales. En esta técnica se aplica el principio de la “Totipotencia”, con el cual una célula tiene la capacidad de regenerar réplicas del organismo del cual se deriva. Dicha totipotencia permite la supervivencia de las plantas luego de ataques de plagas, depredadores o en condiciones ambientales desfavorables (Muñoz, 2012).

Los dos principales problemas que presenta la micropropagación *in vitro* son: la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Para evitar la contaminación se puede realizar la desinfección superficial como el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por un minuto, seguido de

concentraciones variables de hipoclorito de sodio. Posteriormente deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril (Olmos, Luciani y Galdeano, 2010).

Por su parte, la oxidación ocurre por la presencia de compuestos fenólicos oxidados, lo cual está asociado con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés como el daño mecánico producido por el aislamiento del explante de la planta madre. Dichos compuestos fenólicos liberados al medio pueden inhibir el crecimiento e incluso matar al explante. Por ello, para minimizar el daño, se emplean agentes absorbentes de fenoles en el medio de cultivo como el carbón activado o antioxidantes (ácido ascórbico) o bien, cultivando en condiciones de oscuridad (Olmos, Luciani y Galdeano, 2010).

La micropropagación *in vitro* además muestra varias ventajas en comparación a la multiplicación bajo condiciones de campo, entre las cuales se destacan:

- Mayor tasa de multiplicación
- Requiere menos área
- Control fitosanitario más eficiente
- Requiere menos tiempo

Entre las desventajas se menciona que requiere instalaciones, equipo y mano de obra especializados. En la Caña de Azúcar, se puede regenerar de forma directa a partir de segmentos de hojas jóvenes. La regeneración indirecta se puede realizar a partir del callo proveniente de semillas germinadas, de primordios foliares y de meristemas apicales. Esta multiplicación permite obtener como mínimo 500 plantas derivadas de un solo meristemo, listas para trasplante a campo mencionados (Molina y Melgar, 2014).

#### **2.1.10. Cultivo de meristemas y saneamiento**

Los meristemas son grupos de células que se dividen para dar origen a una célula hija que continúa siendo meristemática y otra que se diferencia (Gilbert, 2005). Los meristemas apicales se producen en los extremos en crecimiento del vástago y la raíz. Constituyen la zona de la raíz que consiste en células lubricadas que son liberadas a medida que el meristemo es empujado a través de la tierra por la división celular y el

alargamiento en las células más proximales (figura 2). Los nuevos meristemos apicales de la raíz son iniciados desde el tejido dentro de la médula de la raíz y emergen a través del tejido fundamental y dérmico (Gilbert, 2005).

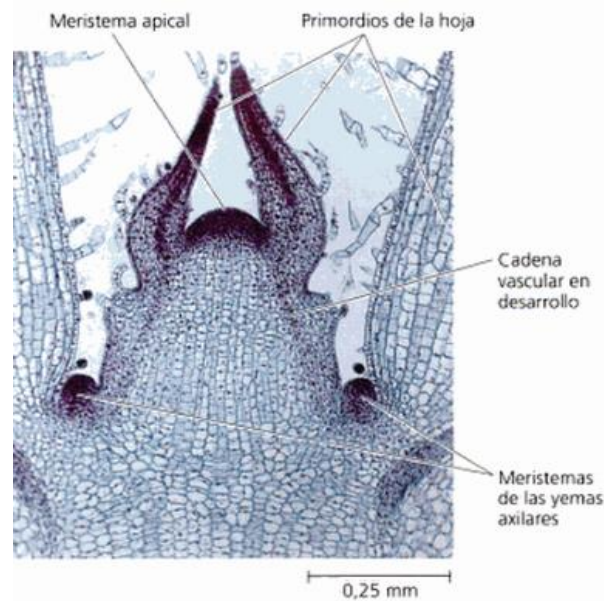


Figura 2. Estructura de la yema terminal (Campbell y Reece, 2007).

El cultivo de meristemos, mediante la organogénesis directa, lleva a la formación de raíces o brotes adventicios en los explantes cultivados *in vitro* sin la formación de callos. Esta es una forma de regeneración de plantas libres de enfermedades. Entre los principales factores que deben ser considerados para la exitosa organogénesis se encuentra el tamaño y la edad fisiológica de los explantes, ya que los tejidos juveniles presentan mayor aptitud que los tejidos de órganos adultos. Otro factor es la luz, temperatura, consistencia del medio de cultivo, el pH y los reguladores de crecimiento, los cuales desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta organogénica (Pérez, Delgado, Hernández y Armas, 2008).

El cultivo de meristemos apicales con un diámetro de 0.1-0.2mm tiene la característica de estar libre de enfermedades causadas por patógenos sistémicos por lo que las plantas obtenidas de estos, también lo estarán (Molina y Melgar, 2014). La razón por la cual están

libres de patógenos es la elevada actividad metabólica, con lo cual es más difícil para los virus invadir las células. Además, presentan elevadas concentraciones de auxinas endógenas existentes en los ápices meristemáticos, lo cual inhibe la multiplicación de los virus. Otra razón por la cual los meristemas están libres de virus, es el sistema vascular poco diferenciado de los meristemas ya que no tienen tejido vascular formado y este mismo es la vía por la cual el virus es transportado al resto de la planta (Conci, 2010).

En base a lo anterior, se realiza el procedimiento de saneamiento que es el siguiente:

- a) Obtención de tallos y corte de yemas
- b) Tratamiento térmico de las yemas
- c) Germinación
- d) Extracción, siembra y desarrollo de los meristemas apicales
- e) Multiplicación de las plantas regeneradas
- f) Diagnóstico mediante marcadores moleculares
- g) Multiplicación de plantas libres de enfermedades
- h) Enraizamiento
- i) Aclimatación

Al alcanzar una altura de 4cm *in vitro*, las plantas formadas a partir de los meristemas, se trasladan a un medio de cultivo líquido, con los mismos componentes que el medio mencionado anteriormente, pero sin adicionar agar. Con ello, tendrán crecimiento y formación de nuevos brotes que se subcultivan y multiplican cada 30 días, hasta un máximo de cinco subcultivos. Luego, se trasladan a otro medio, pero sin BAP, para poder inducir el enraizamiento durante los próximos 15 días. Antes del segundo subcultivo, se toma una muestra de las plantas obtenidas para realizarles el diagnóstico de enfermedades basado en marcadores moleculares. Si las plantas están sanas, entonces se continúa con la micropropagación. Finalmente, se separan las plantas y se siembran en bandejas con sustrato para su posterior aclimatación en invernadero (Molina y Melgar, 2014).



Se destaca la importancia del tratamiento térmico de las yemas ya que algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo. En general, se incluyen patógenos superficiales del material vegetal, además de los patógenos endógenos y los propios del manejo en laboratorio (Olmos, Luciani y Galdeano, 2010). Por ende, la metodología de la combinación de tratamientos hidrotérmicos con la manipulación de los meristemas, favorecen el proceso de saneamiento de enfermedades sistémicas (Arellano-Litardo, *et.al.*, 2015).

### **2.1.11. Cultivo de discos y saneamiento**

Se conoce la regeneración de plantas libres de virus, mediante el cultivo de discos foliares (figura 3) debido a la capacidad histológica del embrión somático de no tener conexión vascular con el tejido a partir del cual fue extraído ya que, generalmente está protegido por la epidermis (Freire, 2003).



Figura 3. Embriogénesis somática a partir de discos de caña de azúcar (Molina y Melgar, 2014).

Existen cuatro fases según detalles fisiológicos en la embriogénesis somática (Fujimura y Komamine citado por Freire, 2003):

1. Fase cero: durante esta fase, las células aisladas sufren continuas divisiones hasta formar los agregados celulares embriogénicos con la presencia de auxina en el medio de cultivo.
2. Fase uno: los agregados de células formados obtienen la habilidad para el desarrollo de embriones cuando la auxina es eliminada del medio de cultivo, dando lugar al estado uno de agregado celular. Durante esta fase, la proliferación de los

agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación durante los tres días después de ser transferido a un medio de cultivo sin auxina. Luego, ocurre una rápida división a los tres o cuatro días de cultivo, en ciertas partes del agregado celular, lo cual da lugar a la formación del embrión en etapa globular que da inicio a la siguiente fase.

3. Fase dos: esta fase es inducida por la transferencia de los agregados celulares en estado uno a un medio de cultivo libre de auxina por lo que ocurre una rápida división celular en ciertas partes del agregado. Después, el embrión globular sufre un proceso de transición en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro.

Los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores como: el genotipo de la planta; las condiciones de cultivo; los reguladores del crecimiento y demás componentes del medio de cultivo; el tipo y estado fisiológico del explante; y el potencial embriogénico (Freire, 2003).

Para inducir la embriogénesis somática se necesita cierta concentración de auxinas y citoquininas en el medio. Las auxinas exógenas pueden inducir la formación de células embriogénicas y también, promover la división mitótica repetitiva durante la fase de inducción de callo, pero se deben eliminar del medio de cultivo una vez que hayan ocurrido dichas divisiones para que proceda la morfogénesis embriogénica (Filippov citado por Alvez y Oropeza, 2015). Por su parte, las citoquininas son necesarias para la inducción de la embriogénesis en muchas especies de dicotiledóneas (Abdi y Hedayat citado por Alvez, B. y Oropeza, 2015).

La respuesta del explante a la adición exógena de auxinas y citoquininas es variable y depende de factores como la especie de la planta, estado de desarrollo del explante, tipo y cantidad de auxina y/o citoquinina (Alvez y Oropeza, 2015).

### **2.1.12. Diagnóstico de enfermedades mediante Marcadores Moleculares**

En este procedimiento se puede identificar un fragmento de ADN o ARN que es exclusivo de un patógeno y que se puede extraer del ADN o ARN de una planta infectada con el mismo, con lo cual se diagnostica su presencia en la muestra. Este diagnóstico de enfermedades se realiza antes de iniciar la micropropagación *in vitro*, de forma que se asegura la sanidad de las plantas producidas (Molina y Melgar, 2014).

Para este procedimiento, se realiza la extracción de ADN o ARN de la planta, luego la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la separación de los fragmentos por electroforesis en gel de Agarosa. La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica durante varios ciclos repetidos en los cuales la secuencia blanco es copiada fielmente. Las etapas principales de las que se compone la PCR son: desnaturalización, hibridación y extensión. Este procedimiento se realiza en equipos llamados “termocicladores”, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifique en cada ciclo (Tamay, Ibarra y Velasquillo, 2013).

Al final de la reacción, los productos obtenidos de la PCR son analizados por medio de la electroforesis en gel de agarosa. Este procedimiento consiste en la separación de grandes moléculas, como los ácidos nucleicos, a través de una matriz sólida que funciona como filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico según el tamaño y carga eléctrica. La separación se realiza bajo una solución buffer o tampón que puede ser TAE (Tamay, Ibarra y Velasquillo, 2013).

En los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, lo cual permite que durante la electroforesis migren hacia el polo positivo. Para ello, se utiliza el gel de agarosa que previamente se prepara se vacía en un recipiente que sirve de base para que se solidifique (Molina y Melgar, 2014). Cuando el gel es corrido, estos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo cual facilita la identificación de los amplicones y si su

tamaño corresponde con el esperado. Dicho tamaño, está dado por el número de pares de bases del amplicón (Tamay, Ibarra y Velasquillo, 2013).

Este diagnóstico presenta la ventaja de ser más sensible que los realizados mediante técnicas inmunológicas, además de ser un ensayo no destructivo (Molina y Melgar, 2014).

Esta metodología de diagnóstico de enfermedades se realiza para las enfermedades de:

- Raquitismo de la soca (RSD)
- Escaldadura foliar (LSD)
- Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV)

El procedimiento de diagnóstico de enfermedades se realiza como parte del saneamiento de variedades, previo a realizar la multiplicación ya que se asegura la sanidad de las plantas producidas (Molina y Melgar, 2014).

#### **2.1.13. Generalidades del Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV)**

Enfermedad causada por el virus del género *Polerovirus* de la familia *Luteoviridae*, su nombre es “Sugar Cane Yellow Leaf Virus” (SCYLV). La enfermedad ha sido encontrada paulatinamente en todos los países cultivadores de caña de azúcar del mundo. En Guatemala, se encuentra cercano al cien por ciento el porcentaje de variedades infectadas con el virus. El análisis de esta enfermedad se realiza en el laboratorio ya que es difícil su identificación debido a que no todas las variedades presentan síntomas visibles (Ovalle, 2014). En el país se observa con mayor severidad en variedades SP 70-1284, CP 72-2086, CP 72-1210 (Comparini, 2006). Posee ARN como material genético y está confinado al floema del huésped (Comstock y Gilbert 2001, citado por Garcés 2007).

#### **2.1.14. Síntomas**

Los síntomas comienzan con el amarillamiento de la nervadura central de las hojas, como en la figura 4, lo cual es notorio en el envés. Al inicio se manifiesta como un amarillamiento pálido y después llega a tomar una coloración intensa, como se muestra en la figura 5.

En algunas variedades, la parte del haz de la nervadura central toma una coloración rosada o rojiza. Luego se observa el secamiento de las puntas de las hojas y en variedades susceptibles, avanza hasta secar completamente la hoja. Las plantas pueden mostrar efecto en el crecimiento, observándose enanismo dependiendo de la susceptibilidad de la variedad. La manifestación de los síntomas está asociado a cualquier tipo de estrés, especialmente por sequía. Se puede confundir con la presencia del Fitoplasma del Amarillamiento de la caña de azúcar (SCYP) (Ovalle, 2014).



Figura 4. Amarillamiento intenso en la nervadura de la hoja (CENICAÑA, 2016).



Figura 5. La hoja superior se encuentra sana y las otras dos, manifiestan diferente intensidad de síntoma (Ovalle, 2014).

### **2.1.15. Métodos de Control**

El método más eficaz es el uso de variedades resistentes (Ovalle, 2014). El manejo agronómico de plantaciones afectadas también influye, ya que los síntomas se han observado con mayor frecuencia en cultivos con estrés causado por déficit de agua en el suelo. Por ello, se debe mantener un adecuado nivel de humedad, así como de fertilidad (Victoria, Guzmán y Cuervo, 1999).

### **2.1.16. Transmisión y diseminación**

El virus no es transmitido mecánicamente, sino por medio de los áfidos vectores como *Melanaphis sacchari* (Pulgón gris) y *Rhopalosiphum maidis*. Igualmente, se puede transmitir mediante el uso de semilla vegetativa tomada de plantas afectadas por el virus y no es eliminado por el tratamiento de semillas con agua caliente (CENICAÑA, 2016).

## **2.2. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA INSTITUCION ANFITRIONA**

### **2.3. Localización**

La empresa anfitriona fue el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA). Se ubica en las coordenadas 14°19'48" latitud norte y 91°03'16" longitud oeste, en la finca Camantulul, km. 92.5 carretera CA-1 en el municipio de Santa Lucía Cotzumalguapa, departamento de Escuintla (Villatoro, 2008).

#### **2.3.1. Historia**

La creación de CENGICAÑA partió de una idea que comenzó en 1980 en la Asociación de Azucareros de Guatemala (ASAZGUA) por la necesidad de mejorar producción y productividad del cultivo, dada la importancia tanto económica como social, de la Agroindustria Azucarera. En 1990 se decidió la creación del Centro, para lo cual en 1991 se realizó un diagnóstico tecnológico el cual determinó los elementos constitutivos para su creación. En enero de 1992, ASAZGUA comienza la fundación del Centro, con lo que se procedió a la contratación de personal profesional y equipo básico. La inauguración

del Centro con la infraestructura actual, ocurrió el día 26 de abril, contando con la participación del Presidente de la República, Licenciado Álvaro Arzú (Villatoro, 2008).

### **2.3.2. Organización**

La agroindustria azucarera que aporta recursos a CENGICAÑA está conformada por 13 ingenios, de los cuales, diez se ubican en la planicie costera del océano Pacífico o costa sur de Guatemala y ocupan casi la totalidad del área sembrada (99%) los cuales son: Tululá, Palo Gordo, Madre Tierra, Pantaleón, La Unión, Concepción, Magdalena, Santa Ana, Trinidad y El Pilar. Los restantes tres son el Ingenio Santa Teresa, La Sonrisa y Chabil Utza, los cuales se ubican en el departamento de Guatemala, en Santa Rosa y en Alta Verapaz, respectivamente. Los ingenios que lo conforman realizan aportes al presupuesto del centro, lo cual es proporcional a la producción obtenida (Villatoro y Pérez, 2014).

CENGICAÑA presenta la siguiente organización de la figura 6 donde la elección de las líneas de investigación con las que se trabaja son definidas por el Comité Técnico Asesor, el cual está formado por los Gerentes Agrícolas de cada Ingenio. El nivel gerencial está conformado por la Asamblea General y la Junta Directiva. La primera está conformada por un representante de nivel gerencial de cada uno de los ingenios y la segunda, por las personas electas específicamente para ello. Dentro de CENGICAÑA, la coordinación de sus actividades está a cargo de la Dirección General (Villatoro y Pérez, 2014).

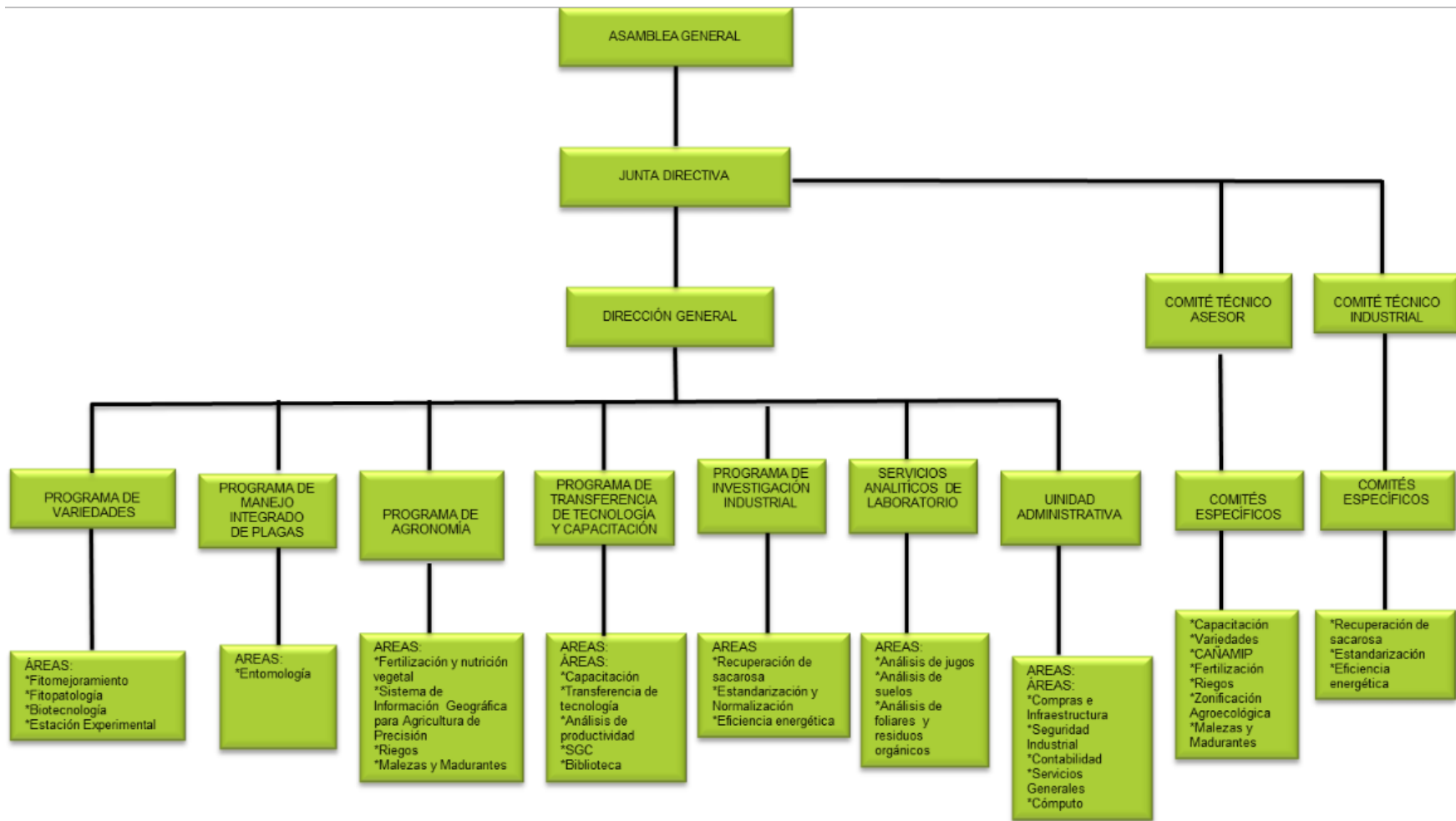


Figura 6. Organigrama de la empresa CENGICAÑA (CENGICAÑA, 2016).



### 3. CONTEXTO DE LA PRÁCTICA

#### 3.1. NECESIDAD EMPRESARIAL Y EJE DE SISTEMATIZACIÓN

En las prácticas se trabajó en el área de Biotecnología que es parte del “Programa de Variedades” en CENGICAÑA, como se muestra en la figura 7, bajo la supervisión del Doctor Luis Molina. Específicamente, se realizó el saneamiento de variedades a través del cultivo *in vitro* de meristemos y discos foliares.

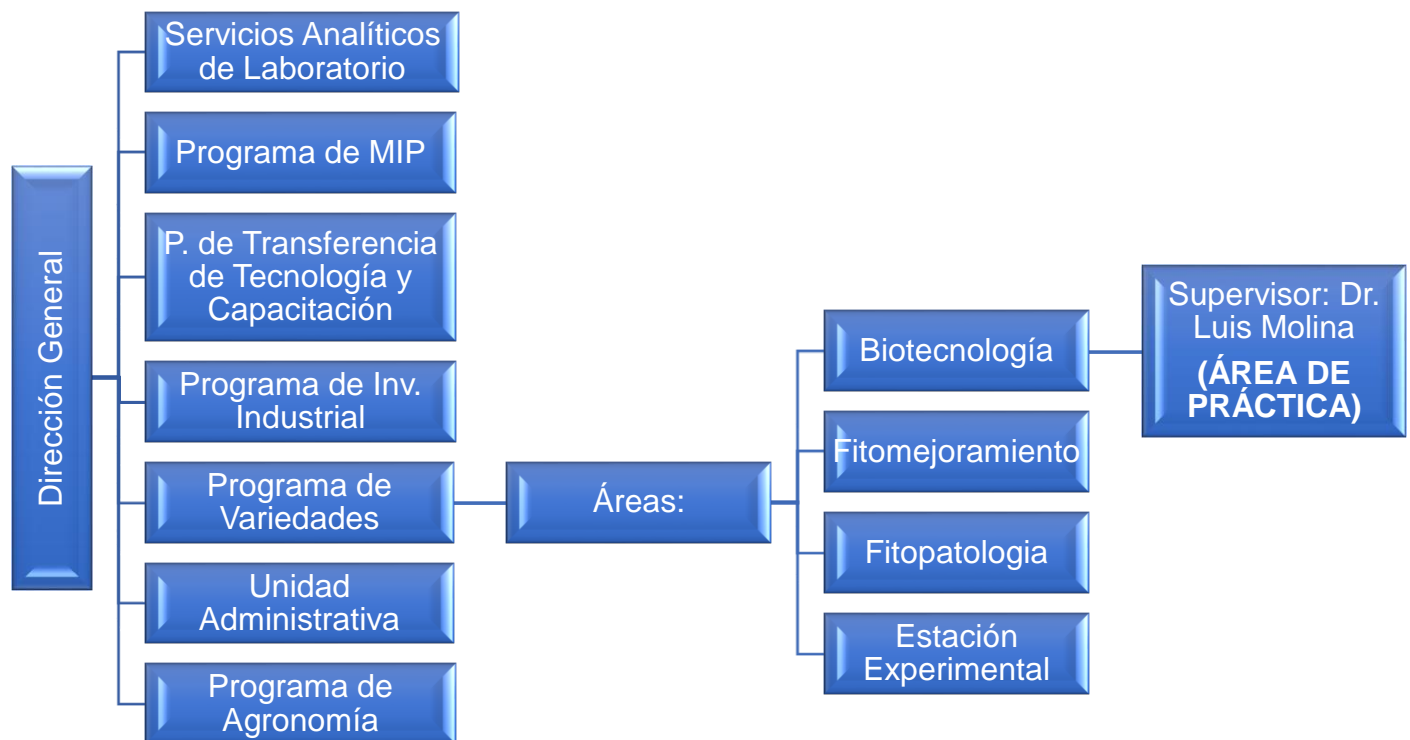


Figura 7. Organigrama del área de sistematización de práctica.

CENGICAÑA se creó específicamente para el desarrollo y la transferencia de tecnología hacia las agroindustrias azucareras para mejorar sosteniblemente la eficacia del sistema productivo. Dicha tecnología deriva a partir de las necesidades prioritarias para el sector azucarero. Entre la tecnología que desarrolla el Centro, se encuentra la de “variedades” de caña de azúcar en el área de “Biotecnología” donde se desarrollan según las

necesidades agroeconómicas, ambientales, de eficiencia energética y de resistencia a plagas y enfermedades.

Dentro del programa de variedades se cuentan con estrategias que conllevan a cuatro objetivos de mejoramiento:

- Mejoramiento del rendimiento de azúcar por unidad de área
- Mejoramiento de la resistencia a enfermedades
- Adaptabilidad
- Habilidad de soqueo

Dentro de las necesidades actuales de la agroindustria azucarera se encuentra la de incrementar el rendimiento de azúcar por tonelada métrica, además de poder contar con variedades que sean resistentes a diferentes plagas y enfermedades, al déficit de nutrientes y riego. De forma que se busca obtener el mayor rendimiento posible, con bajos costos de producción para que sea una actividad más rentable.

CENGICAÑA tiene la necesidad de proveer una solución a las diferentes problemáticas de la industria. Por ello, realiza intercambios de variedades con instituciones internacionales y se evalúan con el “programa de selección”, el cual realiza evaluaciones de la presencia de enfermedades, de la capacidad agronómica, de necesidades de la variedad, así como la capacidad de adaptarse en condiciones climáticas de Guatemala para su posterior multiplicación y liberación.

En esta práctica se realizó el saneamiento de variedades extranjeras provenientes de distintos países. Dichas variedades se analizaron previamente con marcadores moleculares y presentaron el Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV), el cual afecta a casi el cien por ciento de las variedades cultivadas y ocasiona cuantiosas pérdidas. Por ello, fue necesario realizar el saneamiento mediante la micropropagación *in vitro* a partir de los meristemos y discos foliares. Al obtener las plantas libres de enfermedades, se podrá continuar con el “programa de selección” para la liberación de variedades con características agronómicas óptimas y libres de enfermedades.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. GENERAL

Participar en el saneamiento de variedades de caña de azúcar infectadas con el Virus del Amarillamiento Foliar, por medio del cultivo *in vitro* de meristemos y discos foliares, y posteriormente, evaluar el saneamiento con el uso de marcadores moleculares.

### 4.2. ESPECÍFICOS

Apoyar en el proceso de saneamiento del Virus del Amarillamiento foliar, a través de la organogénesis directa (cultivo de meristemos) y la embriogénesis somática (cultivo de discos).

Evaluar, con marcadores moleculares, si las variedades obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de meristemos y discos foliares, fueron saneadas del virus SCYLV.

Monitorear el desarrollo de las plántulas obtenidas.

## 5. PLAN DE TRABAJO

### 5.1. PROGRAMA DESARROLLADO EN CULTIVO DE MERISTEMOS

En el área de Biotecnología de CENGICAÑA se realizó el saneamiento de variedades extranjeras infectadas con el Virus del Amarillamiento Foliar, para lo cual se hizo la micropropagación *in vitro* a partir de meristemos y discos foliares. Posteriormente, se realizó el diagnóstico de la presencia del virus con el uso de marcadores moleculares y se procedió a la multiplicación de las plantas saneadas. Los procedimientos se realizaron de forma aséptica y con equipo previamente esterilizado. Dichos procedimientos se describen a continuación:

#### 5.1.1. Traslado de variedades

Desde el invernadero (Figura 8) en la Ciudad de Guatemala, se trasladaron las variedades extranjeras (cuadro 1) hasta el laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA. Dichas variedades estaban infectadas con SCYLV y debían ser saneadas por medio del cultivo de meristemos y discos foliares. Las variedades provenían de diferentes programas de mejoramiento de los siguientes países: Barbados (B), Brasil (BR), Estados Unidos (CP), Bandjarmasin Hzam, Nigeria (NG) y Mauricio (M).



Figura 8. Invernadero donde se obtuvieron las variedades extranjeras.

Para tomar las muestras, se realizó el corte de cogollos con una navaja que se esterilizaba flameando con alcohol. Conforme se cortaron, se identificaron para su posterior transporte. Las variedades que con la que se trabajó fueron:

Cuadro 1. Variedades extranjeras que presentaron el SCYLV y que necesitaban sanearse a través del cultivo de meristemas.

No.	Variedad	Primer Diagnóstico
1	B 04662	SCYLV
2	B 901227	SCYLV
3	B 971141	SCYLV
4	BR 06009	SCYLV
5	BR 08012	SCYLV
6	BR 9423	SCYLV
7	CP 142425	SCYLV
8	CP 142265	SCYLV
9	CP 122479	SCYLV
10	CP 111956	SCYLV
11	BANDJARMASIN HZAM	SCYLV
12	NG28-037	SCYLV
13	M 93/48	SCYLV

### 5.1.2. Yemas sembradas

Se realizó la limpieza de yemas de agentes contaminantes y posteriormente se realizó la siembra (figura 9). Las yemas brotaron a partir de 15 días y se retiraron. Con el fin de obtener el mayor número de meristemas posibles, las yemas continuaron en bandejas hasta los 30 días. Se les adicionó agua una vez por semana para mantener la humedad en la bandeja y promover la brotación de yemas.



Figura 9. Bandejas donde fueron colocadas las yemas para su germinación, junto con el papel mayordomo humedecido.

- Equipo:

1 sierra

Bandejas plásticas

Papel mayordomo

Agua corriente

Plástico

- Procedimiento:

1. Se retiraron varias hojas de los cogollos, luego se cortaron las yemas con la sierra.
2. Dichas yemas se lavaron con agua y se colocaron en los recipientes plásticos que en el fondo tenían papel mayordomo ligeramente humedecido.
3. Se colocó otro papel mayordomo ligeramente mojado sobre las yemas y un plástico para aumentar ligeramente la temperatura.
4. Se colocaron dentro del laboratorio a (26°C aproximadamente) hasta que brotaron nuevas yemas (figura 10).



Figura 10. Bandejas donde germinaron las yemas.

### 5.1.3. Meristemos apicales extraídos y sembrados

Esta etapa se realizó de forma aséptica para evitar cualquier tipo de contaminación por lo que se limpió previamente el equipo utilizado. A partir de las yemas que brotaron (figura 11), se realizó el siguiente procedimiento:



Figura 11. Yemas que germinaron dentro de las bandejas.

- Equipo:

Cámara de flujo laminar

alcohol al 100%

Solución de cloro al 2.5%

alcohol al 100%

alcohol al 70%

3 pinzas

2 bisturís

2 hojas de bisturís

Estereoscopio

Plástico para sellar tubos de ensayo

1 Erlenmeyer por variedad

Parafilm

Papel mayordomo

Agua desmineralizada

Mechero de alcohol

Cajas petri

1 marcador

Encendedor

Tubos de ensayo con medio de cultivo MS suplementado con 0.1mg/L de BAP, 30g/L de sacarosa y 2 g/L de Phytigel (anexo 1, cuadro 3).

- Procedimiento:

1. Con un bisturí, se cortaron los brotes obtenidos (figura 12).
2. Los brotes fueron lavados con agua corriente, se colocaron en un Erlenmeyer y se sumergieron en alcohol al 100% e inmediatamente se lavaron con agua de nuevo.
3. En el mismo Erlenmeyer, se adicionó cloro al 2.5% hasta que estuvieron sumergidos completamente y se taparon con parafilm. Permanecieron 15 minutos en el cloro (figura 13).
4. Luego, se desechó el cloro y se realizaron 3 lavados con agua desmineralizada y esterilizada.
5. Dentro de la cámara de flujo laminar, se colocó uno de los brotes en una caja petri donde se observó en el estereoscopio (figura 14).
6. Con una pinza y un bisturí, se diseccionó el brote hasta llegar al meristemo apical (figura 15).
7. Cuando se obtuvo el meristemo, inmediatamente se colocó dentro del tubo de ensayo y se sembró sobre el medio.



8. Se cerró el tubo de ensayo con el plástico y se rotuló con un marcador la variedad y la fecha.
9. Se llevó al cuarto de incubación y se mantuvieron en oscuridad durante 7 días. Al transcurrir el tiempo, se colocaron en iluminación (figura 16 y anexo 2 figura 36).



Figura 12. Los brotes fueron cortados con el bisturí para extraerlos.



Figura 13. Erlenmeyer donde se realizó el lavado de los brotes con cloro al 2.5%.



Figura 14. Vista del brote diseccionado hasta el meristemo apical.

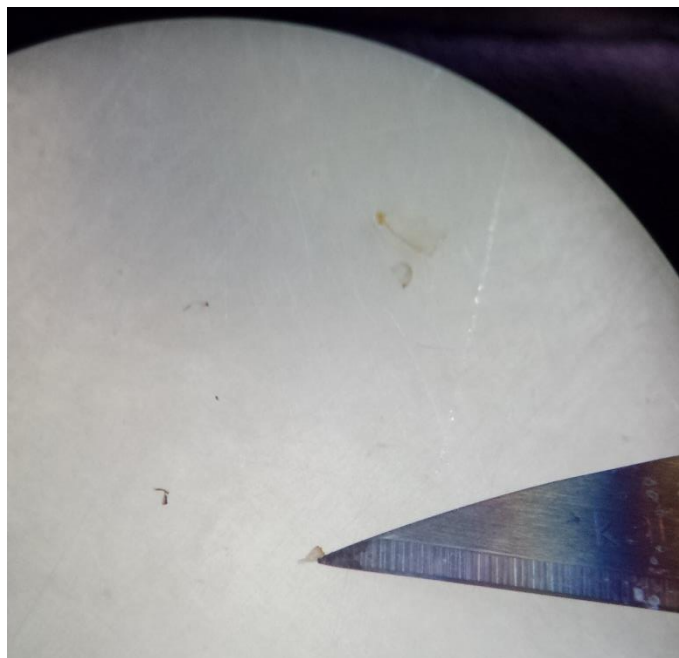


Figura 15. Meristemo extraído, visto desde el estereoscopio.



Figura 16. Meristemos colocados en iluminación.

#### 5.1.4. Meristemos desarrollados y multiplicados

Fueron incubados a 25°C en condiciones de oscuridad durante siete días para disminuir el efecto de la oxidación. Luego, se trasladaron a condiciones de luz por un fotoperiodo de 16 horas. Cuando alcanzaron una altura aproximada de 4 cm, fueron trasladados a frascos con el mismo medio de cultivo anterior pero en frascos (figura 17). Esto se realizó aproximadamente a las 12 semanas después de siembra. El procedimiento fue el siguiente:

- Equipo:

Cámara de flujo laminar

2 pinzas

Plástico

Frascos con medio MS suplementado con 0.1mg/L de BAP, 30g/L de sacarosa y 2 g/L de Phytigel (anexo 1, cuadro 3)

- Procedimiento:
  1. Dentro de la cámara de flujo laminar se retiró el plástico que sellaba el tubo de ensayo y con la pinza se extrajo la plántula regenerada.
  2. Se sembró dentro del frasco con medio fresco.
  3. Se selló el frasco con plástico, se rotuló y se llevó al cuarto de incubación con iluminación.



Figura 17. Meristemos colocados en medio MS sólido en frascos.

### 5.1.5. Tejido tomado para diagnóstico

Para realizar el diagnóstico del virus, primero se tomó la muestra de tejido vegetal fresco para realizar la extracción de ARN. Esto se realizó a las 18 semanas después de siembra y el procedimiento fue el siguiente:

- Equipo

Cámara de Flujo Laminar

Frascos con medio líquido adicionado con 3mg de IBA (anexo 1, figura 3)

Plástico para sellar frascos

Tijeras

2 pinzas

Cajas petri

Marcador

Tubos Eppendorf de 1.5ml

- Procedimiento:
  1. Dentro de la cámara de flujo laminar, se abrió el frasco de la planta saneada y con las pinzas se sostuvo mientras se cortaron las hojas en pequeños fragmentos de tejido que se colocaron en la caja petri.
  2. Con la pinza se colocaron los fragmentos de la caja petri, dentro del tubo Eppendorf.
  3. Al terminar, la planta se colocó dentro del frasco con el medio y se selló con plástico (figura 18).
  4. Dicho procedimiento se realizó con el resto de plantas regeneradas a partir de meristemas.
  5. Los tubos Eppendorf fueron colocados inmediatamente en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Figura 18. Meristemo cortado para muestra y colocado en medio líquido con 3mg de IBA.

#### **5.1.6. ARN extraído**

La extracción de ARN se realizó a los 3 días después de la toma de la muestra de tejido vegetal, con el fin que estuviera lo más fresco posible. El procedimiento se realizó con el Kit de Extracción PROMEGA de la siguiente forma (Locali citado por Molina, *et.al.*, 2014):

- Equipo:

Gradilla para tubos de 1.5ml

Tubos Eppendorf de 1.5ml

Pinzas

Vortex

Puntas de pipeta.

Tijeras

Palillos trituradores

Marcador Punta fina

2 cajas petri

Papel mayordomo

Nitrógeno líquido

Guantes

Centrifugadora

- Soluciones utilizadas:

Tampón De Lavado (anexo 1, cuadro 4)

Tampón De Extracción (anexo 1, cuadro 5)

Fenol:Cloroformo: Isopentanol (anexo 1, cuadro 6)

Isopropanol

Acetato de amonio 7.5M

Etanol 70%

- Procedimiento:

1. En un tubo Eppendorf de 1.5ml se pesó 0.1gr de tejido vegetal fresco.
2. Se sumergió el tubo en nitrógeno líquido y se pulverizó el tejido utilizando un palillo de madera estéril (Figura 19 y figura 20).
3. Se agregó 500ul de "Tampón de Lavado" y se agitó con Vortex.
4. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante, agregando 600ul de "Tampón de Extracción" y se agitó con Vortex. Se incubó a 55°C con agitación constante por 30 minutos.

5. Se agregó 400ul de Fenol:Cloroformo:Isopentanol y se agitó con Vortex. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm.
6. Se transfirió la fase acuosa superior (400ul) a un tubo nuevo, agregando 400ul volumen de Isopropanol frío y 40 volúmenes de Acetato de Amonio 7.5 M. Se mezcló e incubó a -20C por 15 minutos.
7. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. Descartó el sobrenadante y se agregaron 100ul de Etanol al 70% sobre el pellet formado. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm.
8. Descartó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire sobre papel mayordomo (anexo 2, figura 44). Se agregó 25ul de Agua Ultrapura.
9. Se llevó a la incubadora a 55°C durante 3 minutos con agitación constante.
10. Se guardó en refrigeración.

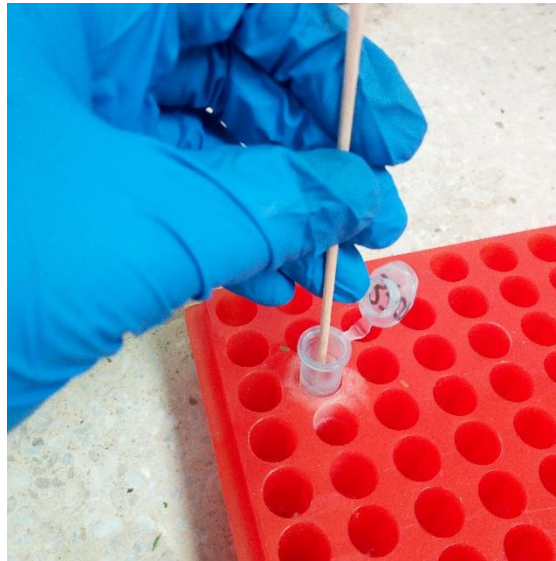


Figura 19. Pulverización de la muestra con nitrógeno líquido.

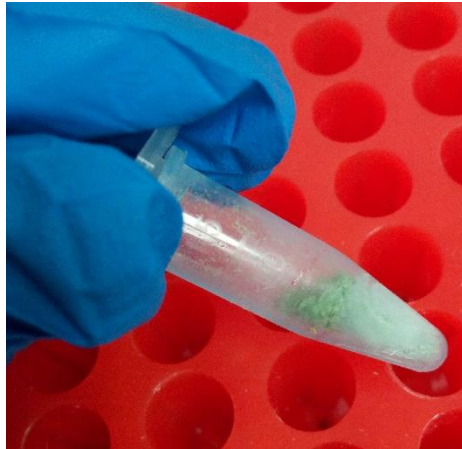


Figura 20. Detalle de la muestra pulverizada con nitrógeno líquido.

#### **5.1.7. Diagnóstico realizado con PCR y electroforesis en gel de Agarosa**

Para esto, primero se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Después, se realizó el diagnóstico con electroforesis en gel de agarosa, con el fin de evaluar la eficacia del saneamiento a través del cultivo de meristemos. La banda indicadora de SCYLV en el gel de agarosa mide 219pb. La electroforesis en gel de agarosa se realizó con el siguiente procedimiento:

- Equipo

Micropipeta de 10 $\mu$ l

Puntas de pipeta

Tiras de parafilm

Escalera (ladder)

Loading die (anexo 1, cuadro 3)

Ladder 100pb

Escalera de SCYLV (anexo 1, cuadro 7)

Termocicladora

AccessQuick Master Mix PROMEGA para PCR

- Procedimiento

1. Se realizó el PCR a las muestras por lo que se les agregó el AccessQuick Master Mix con las cantidades indicadas (anexo 1, cuadro 9).



2. Se colocaron las muestras en la termocicladora con el ciclo apropiado (anexo 1, cuadro 8).
3. Para realizar la electroforesis en gel de agarosa, se preparó el gel mezclando 0.8gr de Agarosa con 40ml de solución TAE<sub>x</sub>1 y calentando esta, hasta que la agarosa se diluyó completamente.
4. Se preparó la cámara del gel, donde se colocó tape en ambos lados.
5. Se vertió la solución anterior en la cámara de gel, se colocó el peine y se esperó hasta la solidificación del gel.
6. Luego, con cuidado se retiró el peine y el tape de ambos lados. Después se colocó dentro de la cámara de electroforesis con solución TAE<sub>x</sub>1.
7. Sobre la tira de parafilm se colocó 1µl de loading die por muestra.
8. Se tomó 5µl de muestra y se mezcló con el loading die colocado sobre el parafilm.
9. Se colocó la muestra en una de las casillas del gel y se colocó la escalera cada 7 pozos llenos.
10. Una vez cargado el gel, se cerró la cámara de electroforesis y se encendió la fuente de poder.
11. Se colocó a 90 Voltios durante 85 minutos.
12. Por último, se observaron los resultados sobre la luz ultravioleta.

#### **5.1.8. Enraizado de plántulas obtenidas**

Las plantas regeneradas a partir de meristemas, se trasladaron de nuevo a frascos con medio de multiplicación líquido adicionados con 3mg de IBA

#### **5.2. PROGRAMA DESARROLLADO EN EL CULTIVO DE DISCOS**

Se realizó el cultivo de discos en las mismas variedades extranjeras con las que se realizó el cultivo de meristemas, con el fin de obtener plántulas libres del virus SCYLV. Para ello, se efectuó la siguiente metodología:

### 5.2.1. Traslado de variedades

Se utilizaron las variedades extranjeras (cuadro 2) obtenidas del invernadero y se trasladaron a CENGICAÑA. Se procedió a realizar el corte de cogollos para la posterior siembra. Las variedades utilizadas fueron:

Cuadro 2. Variedades utilizadas para el cultivo de discos.

No.	Variedad	Primer Diagnóstico molecular
1	B 01209	SCYLV
2	B 04662	SCYLV
3	B 901227	SCYLV
4	B 971141	SCYLV
5	BR 06009	SCYLV
6	BR 08012	SCYLV
7	BR 9423	SCYLV
8	CP 142425	SCYLV
9	CP 142265	SCYLV
10	CP 063103	SCYLV
11	CP 122479	SCYLV
12	CP 111956	SCYLV
	BANDJARMASIN	
13	HZAM	SCYLV
14	NG28-037	SCYLV
15	M 93/48	SCYLV

### 5.2.2. Cogollos limpiados y discos sembrados

Se realizó la limpieza de los cogollos con el fin de retirar contaminantes superficiales para sembrarlos posteriormente.

- Equipo:

Cajas petri con medio MS con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (anexo 1, cuadro 3)

Cámara de flujo laminar

2 bisturís

2 pinzas

Mechero de alcohol

Parafilm

Plástico

Probeta

Agua desmineralizada y esterilizada

Cloro al 2.5%

Papel mayordomo

- Procedimiento:

1. Se separó el cogollo del resto de la caña, se retiraron todas las hojas y se lavó con agua para eliminar restos superficiales.
2. Se colocaron los cogollos dentro de probetas y se llenaron con cloro al 2.5% (figura 21), luego se taparon con parafilm. Se dejaron sumergidas durante 20min.
3. Al terminar los 20 minutos, se vertió el contenido de cloro y se realizaron tres lavados con agua desmineralizada y esterilizada.
4. Luego, dentro de la cámara de flujo laminar se colocó el cogollo sobre un papel mayordomo. Con el uso de pinzas y un bisturí, se retiraron 2-3 hojas más del cogollo.
5. Posteriormente se realizaron varios cortes transversales. Se flamearon de nuevo las pinzas y el bisturí, luego se realizaron los cortes transversales de aproximadamente 0.5cm de grosor.
6. Se sembraron en medio sólido MS preparado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético en cajas petri.
7. Luego de sembrar aproximadamente 5 discos por caja petri (figura 22), se sellaron con parafilm y rotularon con la variedad y la fecha.
8. Después, se incubaron a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  en oscuridad durante 7 días.

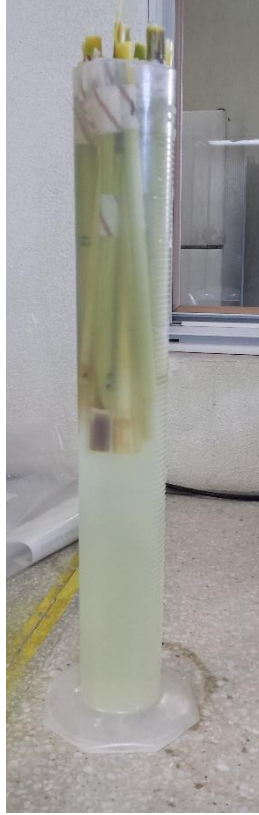


Figura 21. Limpieza de cogollos en la probeta con cloro al 2.5%.



Figura 22. Discos foliares sembrados en cajas petri.

### 5.2.3. Discos sembrados en nuevo medio

Al transcurrir los primeros 7 días en oscuridad. Se realizó la siembra de los discos al medio para la formación de discos. Esto se realizó de la siguiente forma:

- Equipo

Cámara de flujo laminar

Plástico

1 pinza

Mechero de alcohol

Frascos con medio MS (anexo 1, cuadro 3)

- Procedimiento:

1. Los discos se trasladaron a un medio MS sin ácido 2,4-diclorofenoxiacético en frascos colocando aproximadamente 3-4 discos en cada uno. Se sellaron con plástico y se rotularon (figura 23).
2. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación (figura 24) hasta que se desarrollaron.
3. Se realizaron cambios al mismo medio cada aproximadamente 20 días.
4. Al desarrollarse, se colocaban en frascos separados para permitir el crecimiento.



Figura 23. Discos trasladados al medio de formación de discos.

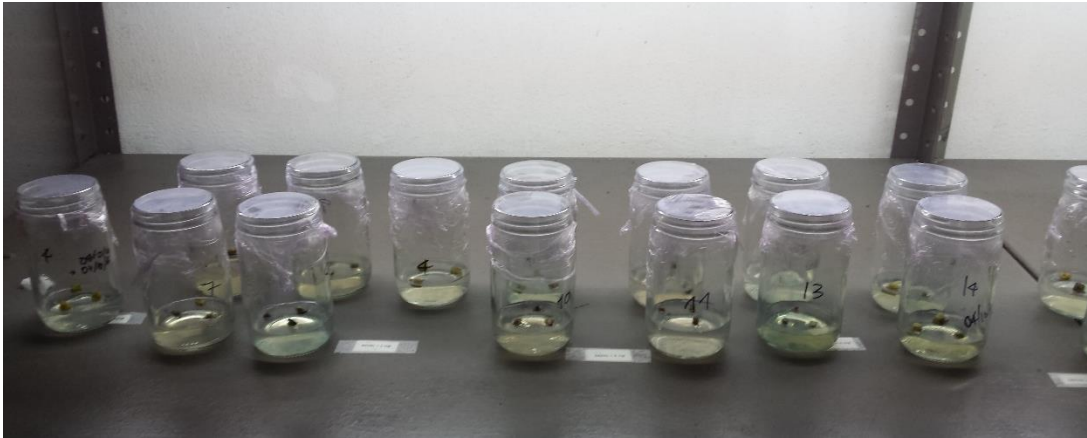


Figura 24. Frascos colocados en el cuarto de incubación.

#### 5.2.4. Tejido tomado para diagnóstico

Cuando la plántula estaba suficientemente desarrollada (figura 25), se tomó la muestra de tejido vegetal con el que se realizó el análisis de ARN y se verificó si estaba libre del virus SCYLV. Esto se realizó a las 12 semanas después de siembra.



Figura 25. brotes donde se tomó la muestra de tejido vegetal.

- Equipo

Cámara de Flujo Laminar

Frascos con medio MS sin 2,4-D y con 3mg de IBA (anexo 1, cuadro 3)

Plástico para sellar frascos

Tijeras

2 pinzas

Cajas petri

Marcador

Tubos Eppendorf de 1.5ml

- Procedimiento:

1. Dentro de la cámara de flujo laminar, se abrió el frasco de la planta saneada y con las pinzas se sostuvo mientras se cortaban las hojas en pequeños fragmentos de tejido que se colocaron en la caja petri.
2. Con la pinza se colocaron los fragmentos de la caja petri, dentro del tubo Eppendorf.
3. Al terminar, la planta se colocó dentro del frasco con el medio y se selló con plástico.
4. Dicho procedimiento se realizó con el resto de frascos.
5. Los tubos Eppendorf se colocaron inmediatamente en refrigeración a -20°C.

### **5.2.5. ARN extraído**

Se realizó la extracción de ARN a las 13 semanas después de siembra, con el Kit de Extracción PROMEGA con el siguiente procedimiento (Locali citado por Molina, *et.al.*, 2014):

- Equipo:

Gradilla para tubos de 1.5ml

Tubos Eppendorf de 1.5ml

Pinzas

Vortex

Puntas de pipeta.

Tijeras

Palillos trituradores

Marcador Punta fina

2 cajas petri

Papel mayordomo

Nitrógeno líquido

Guantes

Centrifugadora

- Soluciones utilizadas:

Tampón De Lavado (anexo 1, cuadro 4)

Tampón De Extracción (anexo 1, cuadro 5)

Fenol:Cloroformo: Isopentanol (anexo 1, cuadro 6)

Isopropanol

Acetato de amonio 7.5M

Etanol 70%

- Procedimiento:

1. En un tubo Eppendorf de 1.5ml se pesó 0.1gr de tejido vegetal fresco.
2. Se sumergió el tubo en nitrógeno líquido y se pulverizó el tejido utilizando un palillo de madera estéril.
3. Se agregó 500ul de "Tampón de Lavado" y se agitó con Vortex.
4. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante, agregando 600ul de "Tampón de Extracción" y se agitó con Vortex. Se incubó a 55°C con agitación constante por 30 minutos.
5. Se agregó 400ul de Fenol:Cloroformo:Isopentanol y se agitó con Vortex. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm.
6. Se transfirió la fase acuosa superior (40ul) a un tubo nuevo (figura 26), agregando 400ul de Isopropanol frío y 40ul volúmenes de Acetato de Amonio 7.5 M. Se mezcló e incubó a -20C por 15 minutos.
7. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. Descartó el sobrenadante y se agregaron 100ul de Etanol al 70% sobre el pellet formado. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm (figura 27).
8. Descartó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire sobre papel mayordomo. Se agregó 25ul de Agua Ultrapura.



9. Se llevó a la incubadora a 55°C durante 3 minutos con agitación constante.
10. Se guardó en refrigeración.

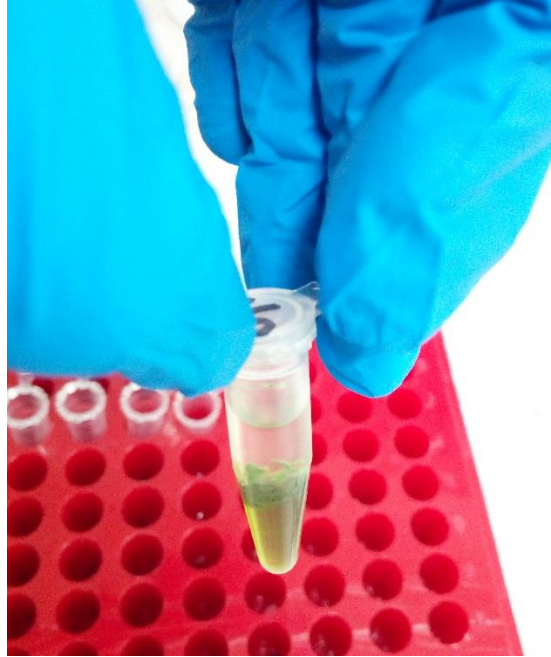


Figura 26. Fase acuosa transferida en el paso 6.



Figura 27. Centrifugadora utilizada a 13,000rpm.

### 5.2.6. Diagnóstico realizado con PCR y electroforesis en gel de Agarosa

A las 14 semanas después de siembra se realizó el análisis de electroforesis en gel de agarosa para detectar la presencia de SCYLV en las muestras. Para esto, primero se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa. La banda indicadora del virus SCYLV mide 219pb y el procedimiento fue el siguiente:

- Equipo

Micropipeta de 10 $\mu$ l

Puntas de pipeta

Tiras de parafilm

Escalera (ladder)

Loading die (anexo 1, cuadro 3)

Ladder 100pb

Escalera de SCYLV (anexo 1, cuadro 7)

Termocicladora

AccessQuick Master Mix PROMEGA

- Procedimiento

1. Se realizó el PCR a las muestras por lo que se les agregó el AccessQuick Master Mix con las cantidades y concentraciones indicadas (anexo 1, cuadro 10).
2. Se colocaron en la termocicladora con el ciclo apropiado (anexo 1, cuadro 8).
3. Se preparó el gel mezclando 0.8gr de Agarosa con 40ml de solución TAE<sub>x1</sub> y calentando esta, hasta que la agarosa se diluyó completamente.
4. Se preparó la cámara del gel, donde se colocó tape en ambos lados.
5. Se vertió la solución anterior en la cámara de gel, se colocó el peine y se dejó solidificar.
6. Luego, con cuidado se retiró el peine y el tape de ambos lados. Después se colocó dentro de la cámara de electroforesis con solución TAE<sub>x1</sub>.
7. Sobre la tira de parafilm se colocó 1 $\mu$ l de loading die por muestra.

8. Se tomó 5µl de muestra y se mezcló con el loading die colocado sobre el parafilm.
9. Se colocó la muestra en una de las casillas del gel y se llenó con la escalera cada 7 pozos.
10. Una vez cargado el gel, se cerró la cámara de electroforesis y se encendió la fuente de poder.
11. Se colocó a 90 Voltios durante 85 minutos.
12. Por último, se observaron los resultados sobre la luz ultravioleta.

### **5.2.7. Enraizado de plántulas obtenidas**

Las plantas regeneradas a partir de meristemos, se trasladaron de nuevo a frascos con medio de multiplicación líquido adicionados con 3mg de IBA.

### **5.3. INDICADORES DE RESULTADO**

Se realizó el saneamiento de variedades extranjeras infectadas con el Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV), a través del cultivo *in vitro* de meristemos y discos foliares. Posteriormente, se realizó de nuevo el diagnóstico con marcadores moleculares para verificar si el procedimiento fue eficaz. Para ello, se analizaron los siguientes indicadores:

- Se adjuntaron las fotografías que respaldan los procedimientos realizados para el saneamiento de las variedades extranjeras con el cultivo de meristemos y discos.
- Se adjuntaron fotografías del procedimiento de extracción de ARN en meristemos y discos foliares.
- Se adjuntó el resultado de la electroforesis en gel de agarosa donde se analizó la presencia de SCYLV en las plantas regeneradas a partir del cultivo de *in vitro* de meristemos y de discos.
- Se adjuntó el resultado del porcentaje de éxito en el desarrollo del cultivo *in vitro* de meristemos, así como el porcentaje de contaminación, oxidación y falta de desarrollo.
- Se adjuntó el resultado del porcentaje de éxito en el saneamiento de las variedades y contaminaciones del cultivo de discos.

- Se anexaron fotografías de las plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de meristemos y discos al final del procedimiento.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Meristemos

El cultivo *in vitro* de meristemos se realizó por medio de la organogénesis directa. El 10% de los meristemos sembrados se desarrollaron y el 100% de estos se saneo del Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Se realizaron 7 siembras de meristemos las cuales corresponden a las siguientes fechas en orden: 03/10/2016, 04/10/2016, 05/10/2016, 10/10/2016, 14/10/2016, 17/10/2016, 10/11/2016. Obteniendo un total de 80 meristemos sembrados (anexo 1, cuadro 9).
- En dos variedades (B01209, CP063103) las yemas no brotaron por lo que no pudo obtenerse el material para extraer meristemos debido a que ambas variedades presentaron baja capacidad para desarrollar brotes.
- En el cuadro 12 (anexo 1) se enumeran las variedades de los meristemos que se desarrollaron con éxito (anexo 2, figura 37), lo que representa el 10% del total sembrados. Generalmente en la empresa se obtiene el 30% de éxito en la regeneración a partir de meristemos, lo que representa una diferencia del 20% menos al realizarse durante este trabajo.
- Lo anterior demuestra que el 90% sufrieron de contaminación, oxidación o no se desarrollaron. El porcentaje de meristemos no desarrollados (figura 28) fue del 20%, el porcentaje de oxidados fue del 25% y el porcentaje de contaminación fue del 45%. Dentro del 45%, se obtuvo el 8.75% de contaminación por hongo (figura 29) y el 36.25% de contaminación por bacteria.



Figura 28. Meristemo no desarrollado en el medio de cultivo.

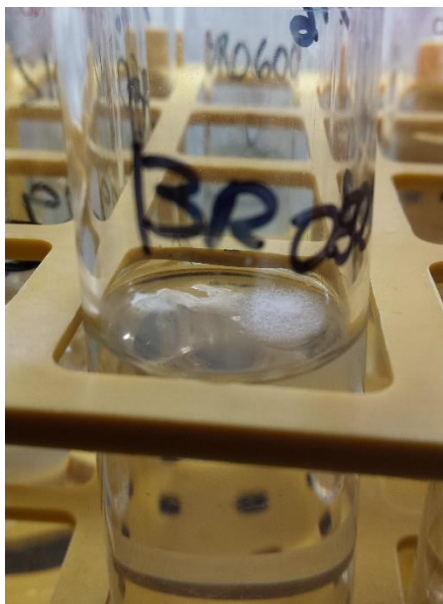


Figura 29. Meristemo contaminado con hongo.

- La organogénesis directa de los meristemas también es influenciada por factores como la consistencia del medio de cultivo y algunos tubos de ensayo presentaron agua en la superficie del medio, lo cual pudo ser causante de contaminaciones en los meristemas. Esto pudo ocurrir por una inadecuada realización del medio, donde el Phytigel no se disolvió correctamente. Al presentar agua en la superficie del medio, el meristemo sembrado cerca de la superficie se contaminó rápidamente.

- La mayor causa de pérdida de meristemas fue la contaminación por bacteria (figura 30), lo cual pudo ser causado por varios factores como la falta de utilización de mascarilla dentro de la cámara de flujo laminar al momento de la siembra.
- Otra importante causa de la contaminación por bacteria fue la falta del tratamiento térmico de las yemas, lo cual no se realizó debido a que las variedades eran muy jóvenes. Sin el tratamiento térmico, algunos patógenos permanecieron latentes y se expresaron al ser transferidos al medio de cultivo, especialmente los patógenos superficiales del material vegetal y los patógenos endógenos. Por ello, es necesaria la combinación de tratamientos hidrotérmicos para el cultivo de meristemas y así favorecer el proceso de saneamiento de enfermedades sistémicas como el SCYLV especialmente en variedades de mayor edad fisiológica.



Figura 30. Contaminación del meristemo por bacteria.

- La segunda causa de mayor pérdida de meristemas fue la oxidación (figura 31) donde se aprecia la coloración marrón, lo cual es causado por la presencia de compuestos fenólicos oxidados. Para evitarlo, los meristemas se mantuvieron en oscuridad durante 7 días posteriores a la siembra, sin embargo, no fue medida suficiente para evitar la oxidación que pudo estar asociada a la situación de estrés

por el daño mecánico al aislar el meristemo. Los compuestos fenólicos liberados en la oxidación causaron la inhibición del crecimiento y la posterior muerte del meristemo.



Figura 31. Muerte del meristemo por oxidación la octava semana después de siembra.

- La liberación de compuestos fenólicos fue lenta por lo que se oxidaron entre la séptima y novena semana después de siembra.
- Este problema se pudo haber reducido al utilizar agentes antioxidantes, los cuales no estaban incluidos en el medio de cultivo utilizado. Así mismo, se pudo utilizar agentes absorbentes de fenoles en el medio o realizar el cultivo en condiciones de oscuridad.
- La organogénesis directa que se llevó a cabo en los meristemos sembrados, hizo que se formaran brotes, sin la formación de callo (anexo 2, figura 38). Esto se pudo llevar a cabo por la citocinina adicionada al medio que fue la 6-Bencilaminopurina (BAP), con la cual se induce el crecimiento de brotes.
- Después de las 12 semanas de sembrado, se trasladaron al medio MS (suplementado con 0.1mg/L de BAP, 30g/L de sacarosa y 2 g/L de Phytigel) en frascos (anexo 2, figura 40).
- Después del corte del material vegetal para la extracción de ARN, a las 18 semanas después de siembra, se trasladaron los meristemos a medio líquido MS

con 3mg de IBA. Esto se realizó debido a que el ácido Indolbutírico (IBA) es una auxina que estimula la formación de raíces sin causar efectos fitotóxicos lo cual se observó en las plántulas (anexo 2, figura 39).

- En la electroforesis en gel de agarosa se obtuvieron todas las muestras negativas (figura 32) por lo que el saneamiento por medio de la organogénesis directa con cultivo de meristemos, es un método 100% eficiente para la eliminación del Virus del Amarillamiento Foliar en caña de azúcar (SCYLV).
- El saneamiento se realizó debido sistema vascular poco diferenciado de los meristemos ya que no tienen tejido vascular formado y este mismo es la vía por la cual el virus es transportado al resto de la planta, por ende, el SCYLV no fue encontrado en el análisis de electroforesis.
- Las variedades saneadas por este procedimiento fueron: CP14-2425, CP12-2479, BR06009 (3 meristemos), CP14-2265 (2 meristemos), BANDJARMASIN HZAM.

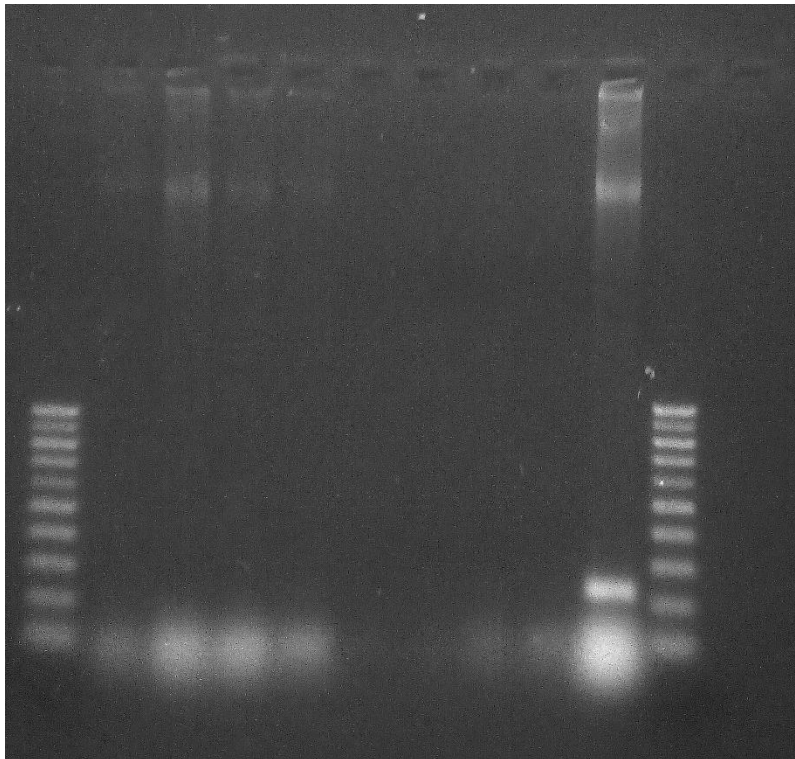


Figura 32. Gel resultado de la electroforesis, donde se observan las 8 muestras libres de virus (de izquierda a derecha). En la última muestra se encuentra el control del virus SCYLV.



## 6.2. Discos

Los discos foliares se cultivaron *in vitro* por medio de la embriogénesis somática. El 66.66% de los discos foliares sembrados se desarrollaron y el 90% de estos se sanearon del Virus del Amarillamiento Foliar (SCYLV). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Se sembraron en medio MS adicionado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético ya que es una auxina que induce divisiones mitóticas y el alargamiento celular durante la fase cero de inducción de callo. En esta fase las células aisladas sufrieron continuas divisiones hasta formar los agregados celulares embriogénicos con la presencia de auxina (2,4-D) en el medio de cultivo.
- Posteriormente a los 7 días después, se sembraron en medio MS sólido en frascos (anexo 2, figura 42) debido a que se debe eliminar del medio de cultivo el 2,4-D cuando han ocurrido dichas divisiones celulares para que pueda dar lugar a la embriogénesis somática, con lo cual inicia la fase 2 (figura 33). En dicha fase, la proliferación de los agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación durante los tres días después de ser transferido a un medio de cultivo sin auxina. En esta etapa se sembraron discos en 66 frascos con 5 discos cada uno (anexo 1, cuadro 13).
- Después, ocurrió la fase dos donde se llevó a cabo la rápida división celular en ciertas partes del agregado. El embrión globular sufrió el proceso de transición en el cual se alargó.

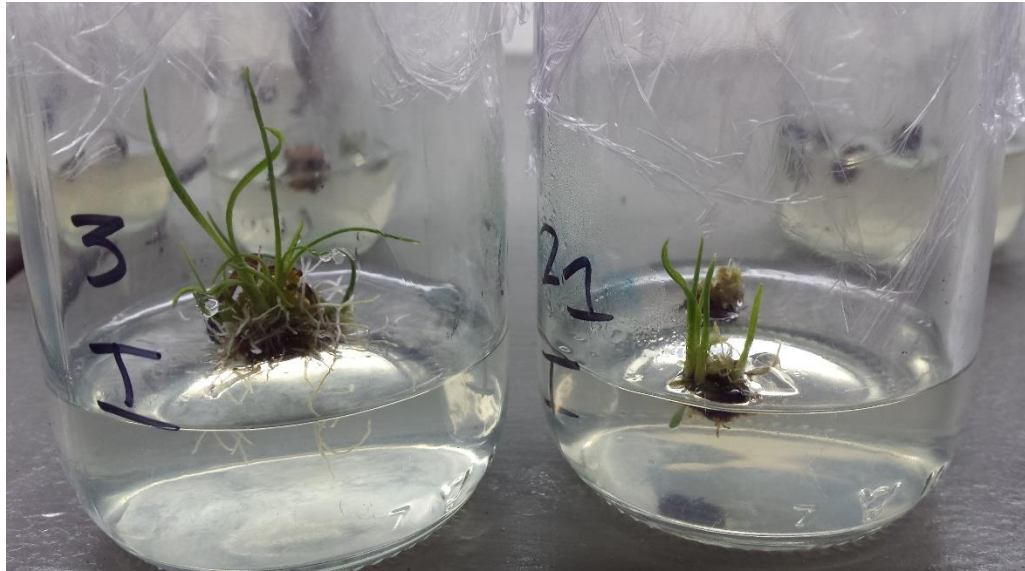


Figura 33. Discos con brotes y raíces formadas por medio de la embriogénesis somática.

- Se reemplazó el medio cada 20 días para un adecuado desarrollo.
- Debido a la liberación de compuestos fenólicos que se debe a la manipulación mecánica del explante, ocurrió la oxidación de explantes (figura 34). Además, el medio de cultivo no tenía adicionado algún agente antioxidante para evitar dicho problema. Esto causaba la posterior muerte de los discos.

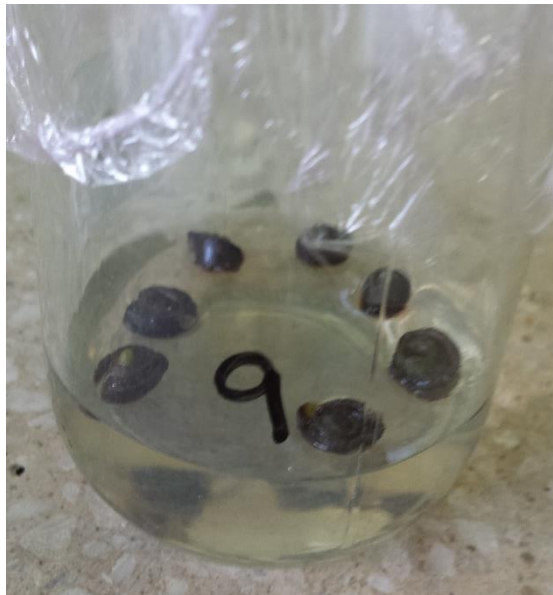


Figura 34. Discos oxidados de la variedad B90-1227.

- Las variedades que presentaron alta capacidad embriogénica fueron: CP111956, CP122479, CP142265, BR9423. Pertenecientes a Canal Point (Florida, Estados Unidos) y a Brasil.
- De las siguientes variedades no se obtuvieron plántulas a partir de la embriogénesis somática: B971141, CP063103, BANDJARMAZIN HZAM, MG28-03, M93-48. Esto se debe a factores como el genotipo de la planta, el estado fisiológico del explante, entre otros factores que pudieron afectar la capacidad embriogénica. Dichas variedades murieron por oxidación o falta de desarrollo.
- En base a lo anterior, el 66.66% (10 variedades) presentaron embriogénesis somática adecuada (anexo 2, figura 43) y el 33.33% (5 variedades) no se pudo regenerar a partir de los discos foliares.
- A las 14 semanas después de la siembra de discos, se realizó la electroforesis en gel de Agarosa (figura 35) donde se analizaron las siguientes variedades, en orden de izquierda a derecha: B01209, B04662, B901227, BR06009, BR08012, BR9423, CP142425, CP142265, CP122479, CP111956. El virus SCYLV se presentó en la séptima variedad analizada, la cual fue CP14-2265.
- En cuanto al resultado de la electroforesis en gel de agarosa, el 90% de las plántulas se sanearon a partir de los discos foliares lo que demuestra que fue eficiente la embriogénesis somática para el saneamiento de las variedades infectadas con SCYLV. Esto se debe a la capacidad histológica del embrión somático de no tener conexión vascular con el tejido a partir del cual fue extraído ya que, generalmente está protegido.
- El 10% de las variedades evaluadas en la electroforesis no se saneó y corresponde a la variedad CP14-2265. Esto se debe a que el virus ya había infectado el cogollo donde se extrajo el disco lo cual pudo ser causado por el estado fisiológico del explante que pudo ser de mayor edad fisiológica. Así mismo, la muestra pudo ser afectada por el genotipo de la planta perteneciente a Canal Point (Florida, Estados Unidos) y también por el potencial embriogénico que presenta la variedad.

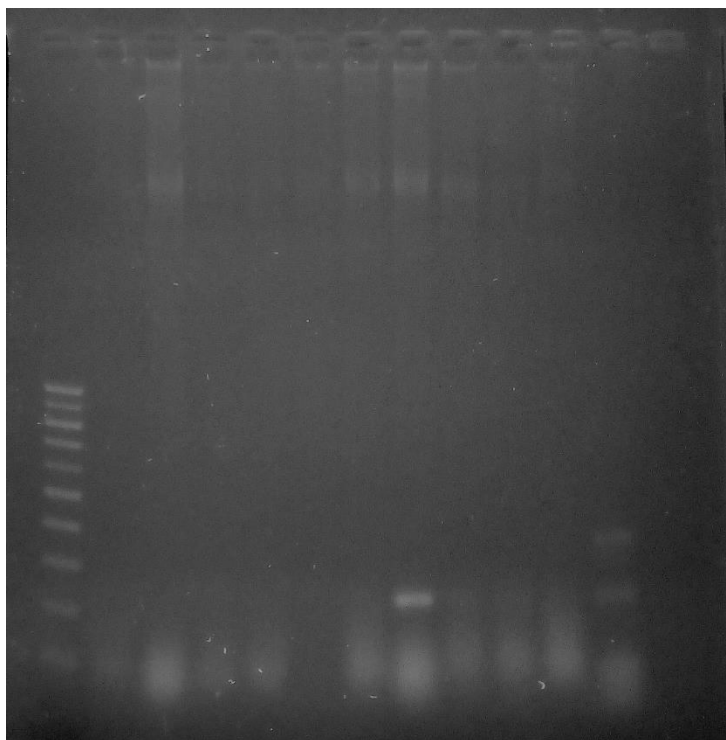


Figura 35. Gel resultado de la electroforesis en gel de agarosa, donde la séptima muestra (de izquierda a derecha) es positiva en la presencia del virus. El control es la undécima muestra donde la banda indicadora mide 219pb para SCYLV.

## 7. CONCLUSIONES

- La eficacia para el saneamiento del virus del Amarillamiento foliar (SCYLV) en la organogénesis directa por el cultivo de meristemas *in vitro* fue del 100%, comparado con el 90% de eficacia del saneamiento por medio de la embriogénesis somática en discos foliares.
- El éxito en el desarrollo de las plántulas obtenidas a través de la embriogénesis somática fue del 66.66% (10 variedades), mientras que el 33.33% (5 variedades) no se pudieron regenerar a partir de los discos foliares.
- Respecto al número de plántulas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de meristemas, se obtuvo el 10% del total sembrado lo cual se debe a distintos factores como la contaminación, oxidación o muerte inmediata del meristemo. Las variedades saneadas por este procedimiento fueron: CP14-2425, CP12-2479, BR06009 (3 meristemas), CP14-2265 (2 meristemas), BANDJARMASIN HZAM. Las cuales provienen de Canal Point (Florida, Estados Unidos), Brasil y Banjarmasin (Indonesia).
- En cuanto al *cultivo in vitro* de discos foliares, las variedades que presentaron alta capacidad embriogénica fueron: CP111956, CP122479, CP142265, BR9423. Pertenecientes a Canal Point (Florida, Estados Unidos) y a Brasil. Contrario a las variedades de las cuales no se obtuvieron plántulas a partir de la embriogénesis somática: B971141, CP063103, BANDJARMASIN HZAM, MG28-03, M93-48. Esto se debió a factores como el genotipo de la planta, el estado fisiológico del explante, entre otros factores que pudieron afectar la capacidad embriogénica.
- La primera causa de la pérdida de meristemas fue la contaminación, que afectó el 45% de los meristemas, siendo el 8.75% causado por hongo y el 36.25% causado por bacteria. El alto porcentaje de contaminación lo cual indica que el protocolo de desinfección y asepsia resultó ineficaz.
- La oxidación fue la segunda mayor causa de pérdida de meristemas con el 25%, lo cual es causado por la liberación de compuestos fenólicos debido a la manipulación mecánica del explante, entre otras causas.
- Con el *cultivo in vitro* de discos foliares se encontró que el 10% de las variedades no se saneó y corresponde a la variedad CP14-2265. Esto se debe a que el virus

pudo haber contaminado el cogollo donde se extrajo el disco y el protocolo de desinfección no fue eficaz.

## **8. RECOMENDACIONES**

Realizar ensayos con el uso de diferentes medios de cultivo para disminuir la oxidación, el cual es uno de los principales problemas en el cultivo *in vitro* de meristemas y discos foliares.

Realizar evaluaciones de diferentes protocolos de desinfección de los cogollos con el fin de disminuir la contaminación que se presenta en el cultivo *in vitro*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alvez, B. y Oropeza, M. (2015) *Efecto de Dicamba y de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre la embriogénesis en caña de azúcar*. Venezuela: Universidad Central de Venezuela.

Arellano-Litardo, A., Korneva, S., Fischer, F., Tola, N., Ramos, M. y Pincay, A. (2015) *Obtención de semilla biotecnológica de caña de azúcar (Saccharum spp. híbrido) de alta calidad genética y fitosanitaria en el Ecuador*. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol XVII, No. 1: 101-110.

Asociación de Azucareros de Guatemala (2012) Economía: producción. Recuperado de: <http://www.azucar.com.gt/economia.html>

Calva, G. y Pérez, J. (2005) *Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro*. Revista Digital Universitaria: Volumen 6, 11.

Castañeda, O., Gómez, F., Trejo, L., Morales, V., González, M., Martínez, Y., Gámez, R. y Solano, M. (2014) *Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en Caña de Azúcar*. México: Agroproductividad.

CBD (2000) *Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Recuperado de: <https://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-es.pdf>

Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (2016) *Virus de la Hoja Amarilla*. Colombia: CENICAÑA. Recuperado de: [http://www.cenicana.org/investigacion/variedades/sanidad\\_vegetal.php?opcion=1&opcion2=6](http://www.cenicana.org/investigacion/variedades/sanidad_vegetal.php?opcion=1&opcion2=6)



Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar - CENGICAÑA-. Organización CENGICAÑA. Recuperado de: <http://www.cengicana.org/>

Comparini, S. (2006) *Evaluación de variedades de caña de azúcar en el Ingenio La Unión, Santa Lucía Cotzumalguapa*. (Tesis para grado de Licenciado) Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Conci, V. (2010) *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina: INTA.

Condemarín, C., Chico, J. y Vargas, C. (2007) *Efecto del Ácido Indolbutírico (IBA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo in vitro de yemas axilares de Encyclia Microtos (RCHB.F.) Hoehne (Orquidaceae)*. Revista Internacional Lankesteriana de Orquideología: Vol 7 (247-254).

FAO (2004) *El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación*. Italia: FAO.

FAOSTAT (2015) *Producción de caña de Azúcar*. Recuperado de: [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*S](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*S)

Freire, M. (2003) *Aspectos Básicos de la Embriogénesis Somática*. Cuba: Universidad Central Marta Abreu. Bioteología Vegetal: Vol. 3 (195-209)

Garcés, B. (2007) *Control del Virus de la hoja Amarilla de la Caña de Azúcar mediante técnicas de cultivo de tejidos en la variedad CR74-250*. Revista Tecnológica ESPOL: Vol 20 (203-208).

Gilbert, S. (2005) *Biología del Desarrollo*. (7ma edición). Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Levitus, G., Echenique, V., Rubenstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (2010) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina: INTA.

Melgar, M. (2014) Desarrollo tecnológico de la Agroindustria Azucarera y Perspectivas. *El cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. (pp. 1-32) Guatemala: CENGICAÑA.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (2014) *Agro en Cifras 2014*. Consultado el 25 de agosto de 2015. Recuperado de: <http://web.maga.gob.gt/download/1agro-cifras2014.pdf>

Molina, L., Avalos, A., Sut, V. y Madaleno, G. (2014) *Manual de Laboratorio: Marcadores Moleculares*. Guatemala: CENGICAÑA.

Molina, L. y Melgar, M. (2014) Biotecnología aplicada al cultivo de la caña de Azúcar. *El cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. (pp. 79-106) Guatemala: CENGICAÑA.

Muñoz, M. (2012) *Biotecnología*. Segunda Edición. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes.

Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2010) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina: INTA.

Osorio, G. (2007) *Manual Técnico de Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura en la producción de Caña y Panela*. Chile: FAO.

Ovalle, W. (2014) Enfermedades de la caña de Azúcar. *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. (pp. 233-258) Guatemala: CENGICAÑA.

Pérez, M., Delgado, M., Hernández, C. y Armas, R. (2008) *Organogénesis indirecta a partir de meristemos apicales caulinares de la variedad cubana de arroz Reforma*. Cultivos Tropicales: Vol. 29 (23-28)

Promega (2017) *AccessQuick RT-PCR System*. Recuperado de: [https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/accessquick-rt\\_pcr-system/?activeTab=0](https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/accessquick-rt_pcr-system/?activeTab=0)

Sánchez, M., Sánchez, C., Villanueva, C., Gil, I., Jiménez, M., Sánchez, I. (2009) *Multiplicación in vitro vía Organogénesis en Calabaza*. México: Agronomía Mesoamericana.

Tamay, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013) *Fundamentos de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Medigrafic: Vol. 2, Numero 2.

Tropicos (2016) Taxonomía. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/25512479>

Victoria, J, Guzmán, M. y Cuervo, E. (1999) *Síndrome de la hoja Amarilla en Colombia*. Colombia: CENICAÑA.

Villatoro, B. (2008) *Evaluación de la Tolerancia a la Sodicidad de Variedades Promisorias de Caña de Azúcar y Servicios Agronómicos en el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar*. (Tesis para el grado de Licenciado) Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Villatoro, B. y Pérez, O. (2014) Caracterización de la Zona Cañera. *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. (pp. 33-44) Guatemala: CENGICAÑA.

## 10. ANEXO

### 10.1. Anexo 1

Cuadro 3. Componentes del Loading die

Componentes	Cantidad
Glicerol (80%)	600µl
Xileno cianol	2.5mg
Bromofenol azul	2.5mg
Agua	400ul

Cuadro 4. Componentes del medio Murashige y Skoog (1962) para 1 litro

Componentes	1000 ml (1 L)
Macro elementos	50 ml
Micro elementos	5 ml
FE/EDTA	5 ml
Vitaminas	10 ml
Kinetina	5 ml
BAP	5 ml
Myo-inositol	0.1 gr
Sacarosa	20 gr
Phytigel	2 gr

Cuadro 5. Componentes del Tampón de Lavado.

Componente	Concentración Final
Tris-HCl, pH 8	10mM
EDTA	1mM
NaCl	2 M
BSA	0.05% (v/v)

Cuadro 6. Componentes del Tampón de Extracción

Componente	Concentración Final
CTAB	2% (p/v)
NaCl	1.4 M
Tris-HCl, pH 8	0.1 M
2-mercaptoetanol	0.5% (v/v)

Cuadro 7. Componentes del Fenol: Cloroformo: Isopentanol.

Componente	Cantidad (ul)
Fenol	25
Cloroformo	24
Isopentanol	1

Cuadro 8. Componentes de la escalera para el Virus del Amarillamiento Foliar.

Componentes	Cantidad
Agua Ultrapura	4ul
6x blue Loading Dye	1ul
Escalera de ADN	1ul

Cuadro 9. Condiciones de PCR (Promega, 2017).

90C – 30 seg	1 ciclo
60C – 30 min	1 ciclo
94C – 1 min	1 ciclo
94C – 30 seg	40 ciclos
60C – 30 seg	40 ciclos
72C – 1 min	40 ciclos
60C – 7 min	1 ciclo

Cuadro 10. Premezcla de PCR utilizado para el SCYLV con el kit PROMEGA en las 8 muestras de los meristemos (Promega, 2017).

Componente	Concentración		Vol (ul)	Vol (total en ul)
	utilizada			
AccessQuick Master Mix				
Promega	1	X	10	80.00
SCYLV f	0.5	uM	2	16.00
SCYLV r	0.5	uM	2	16.00
AMV Reverse				
Transcriptase			1	8.00
Subtotal			15	
ARN	25	ng	5	
Volumen Total de Reacción				20

Cuadro 11. Premezcla de PCR utilizado para el SCYLV con el kit PROMEGA en las 10 muestras de los discos foliares (Promega, 2017).

Componente	Concentración		Vol (ul)	Volumen (total en ul)
	utilizada			
H2O			0	0.00
AccessQuick Master Mix				
Promega	1	X	10	100.00
SCYLV f	0.5	Um	2	20.00
SCYLV r	0.5	Um	2	20.00
AMV Reverse Transcriptase				
Subtotal			15	10.00
ARN	25	Ng	5	
Volumen Total de Reacción				20

Cuadro 12. Meristemas sembrados en las diferentes fechas.

No	Variedad	Primer									
		Diagnóstico molecular	Siembra 1	Siembra 2	Siembra 3	Siembra 4	Siembra 5	Siembra 6	Siembra 7	Siembra total	
1	B 04662	SCYLV						2		2	
2	B 901227	SCYLV							2	2	
3	B 971141	SCYLV			4			2		6	
4	BR 06009	SCYLV			9	5			4	2	20
5	BR 08012	SCYLV	3			4			3		10
6	BR 9423	SCYLV			4			3			7
7	CP 142425	SCYLV		2							2
8	CP 142265	SCYLV	3				3		1	2	9
9	CP 122479	SCYLV		8				1			9
10	CP 111956	SCYLV		5			1				6
	Bandjarmazin										
11	Hzam	SCYLV		1							1
12	NG28-037	SCYLV	3				1	1			5
13	M 93/48	SCYLV							1		1
										80	

Cuadro 13. Comparación del total de meristemos desarrollados con éxito con el cultivo de meristemos.

No	Variedad	Total sembrado	Total desarrollados
1	B 04662	2	0
2	B 901227	2	0
3	B 971141	6	0
4	BR 06009	20	3
5	BR 08012	10	0
6	BR 9423	7	0
7	CP 142425	2	1
8	CP 142265	9	2
9	CP 122479	9	1
10	CP 111956	6	0
11	BANDJARMASIN HZAM	1	1
12	NG28-037	5	0
13	M 93/48	1	0
		80	8



Cuadro 14. Número de frascos de discos foliares sembrados.

No.	Variedad	Primer Diagnóstico molecular	Total Frascos sembrados
1	B 01209	SCYLV	4
2	B 04662	SCYLV	4
3	B 901227	SCYLV	4
4	B 971141	SCYLV	4
5	BR 06009	SCYLV	6
6	BR 08012	SCYLV	4
7	BR 9423	SCYLV/SCMV	6
8	CP 142425	SCYLV/SCMV	8
9	CP 142265	SCYLV/SCYP	6
10	CP 063103	SCYLV	2
11	CP 122479	SCYLV	4
12	CP 111956	SCYLV/SCYP	4
13	BANDJARMASIN HZAM	SCYLV	6
14	NG28-037	SCYLV	2
15	M 93/48	SCYLV	2
			66

## 10.2. Anexo 2

### 10.2.1. Cultivo de meristemos



Figura 36. Meristemos colocados en iluminación en el cuarto de incubación.

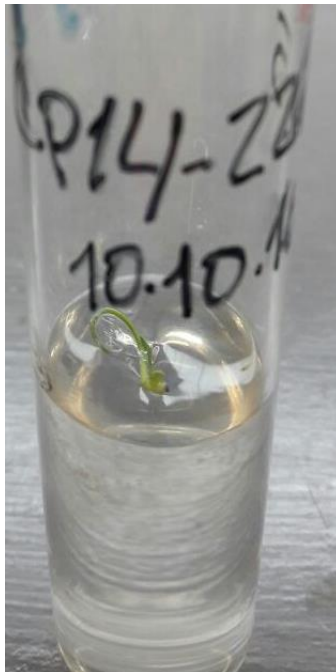


Figura 37. Brote obtenido del meristemo sembrado de la variedad CP14-2265, a las 18 semanas después de siembra.



Figura 38. Brote desarrollado a partir del meristemo a través de la organogénesis directa a las 18 semanas después de siembra.



Figura 39. Meristemos cambiados a medio MS con 3mg de IBA a las 12 semanas después de siembra.



Figura 40. Brote obtenido a partir de meristemo, a las 12 semanas después de siembra.



Figura 41. Brote obtenido a partir de la organogénesis directa a las 12 semanas después de siembra.

### 10.2.2. Cultivo de discos

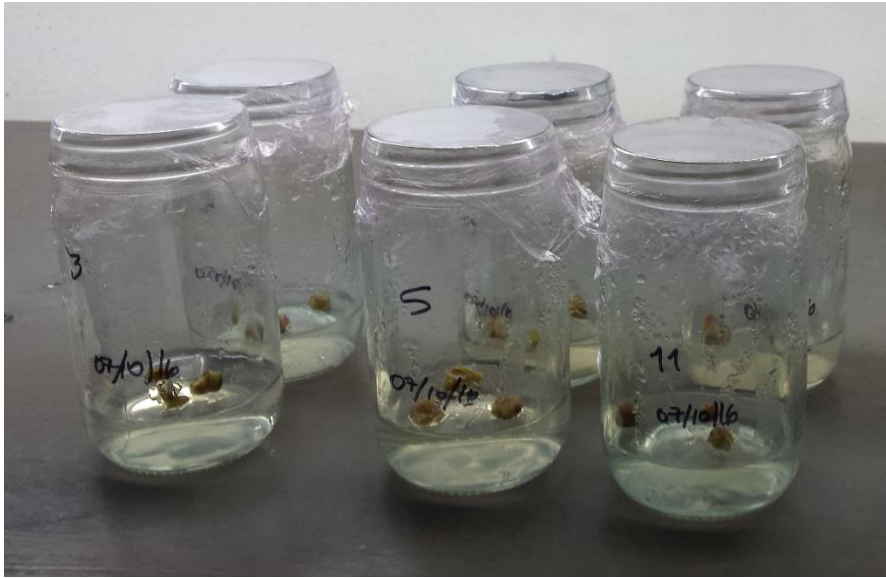


Figura 42. Discos foliares a las 2 semanas después de siembra en frascos con medio MS.



Figura 43. Plántulas obtenidas a partir de la embriogénesis somática. Desarrollo a las 13 semanas después de siembra.



Figura 44. Pellet de ARN obtenido a partir de la extracción de ARN.