

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

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOSIS DE AZIDA DE SODIO SOBRE LA REGENERACIÓN DE
CALLO EN CAÑA DE AZÚCAR
SISTEMATIZACIÓN DE PRÁCTICA PROFESIONAL

MAURICIO RENÉ MONROY AGUILAR
CARNET 22079-13

ESCUINTLA, JUNIO DE 2018
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

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

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOSIS DE AZIDA DE SODIO SOBRE LA REGENERACIÓN DE
CALLO EN CAÑA DE AZÚCAR
SISTEMATIZACIÓN DE PRÁCTICA PROFESIONAL

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

POR
MAURICIO RENÉ MONROY AGUILAR

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

ESCUINTLA, JUNIO DE 2018
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

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

DECANA: LIC. ANNA CRISTINA BAILEY HERNÁNDEZ

SECRETARIO: MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

DIRECTOR DE CARRERA: MGTR. JOSÉ MANUEL BENAVENTE MEJÍA

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN
ING. LUIS GERARDO MOLINA MONTERROSO

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN
MGTR. HÉCTOR ALFREDO SAGASTUME MENA

Guatemala, junio de 2018

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 Mauricio René Monroy Aguilar, carné 22079-13 titulada: "Evaluación del efecto de dosis de azida de sodio sobre la regeneración de callo en caña de azúcar".

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

Atentamente,



Dr. Luis Gerardo Molina Monterroso

Colegiado no. 1465

Cod. URL: 10869



Universidad
Rafael Landívar

Tradición Jesuita en Guatemala

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
No. 06955-2018

Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Sistematización de Práctica Profesional del estudiante MAURICIO RENÉ MONROY AGUILAR, Carnet 22079-13 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES, de la Sede de Escuintla, que consta en el Acta No. 06108-2018 de fecha 23 de junio de 2018, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOSIS DE AZIDA DE SODIO SOBRE LA REGENERACIÓN DE CALLO EN CAÑA DE AZÚCAR

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

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 27 días del mes de junio del año 2018.



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

Agradecimientos

A Dios:

Por guiarme en mi camino y darme salud y vida para poder cumplir mis metas. Por todas las bendiciones en mi vida.

A la Universidad Rafael Landívar:

Por ayudarme a formarme profesionalmente.

A mi asesor:

Dr. Luis Gerardo Molina Monterroso.

Por la asesoría, revisión y corrección de mi informe final.

A mi supervisor:

Ing. Agr. Victoriano Sun Pérez.

Por toda la experiencia adquirida en el proceso de práctica.

A CENGICAÑA:

Empresa fundamental en el desarrollo de mi carrera, por brindarme el apoyo para realizar mi práctica profesional.

A mis amigos: Néstor Estuardo Barillas Castañeda y María Felisa Sacan Alvarado por estar en los buenos y malos momentos.

Dedicatoria

A Dios: Por tu misericordia que no tiene fin. Gracias por estar presente en cada etapa de mi vida ofreciéndome lo mejor. Gracias Padre Divino.

A mi padre: Hugo Rene Monroy Quiñonez. Por apoyarme y enseñarme entre lo bueno y lo malo, por nunca perder la fe en mí y por enseñarme siempre a creer en Dios.

A mi madre: Juana Maria Aguilar Morales. Por enseñarme a luchar por lo que quiero. Te amo mamá por nunca perder la fe en mí.

A mi hija: Johana Daniela Monroy Macario. Por ser mi motivación de seguir siempre adelante. Gracias beba.

A mi esposa: Jakelyne Melyssa Macario Salazar. Por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada paso que doy. La amo.

A mi hermano: Hugo Rolando Monroy Aguilar. Por siempre creer en mí y apoyarme y motivarme a que siga adelante y que todo lo puedo lograr si me lo propongo. Gracias enano te amo.

A mis tíos: José Cecilio Azurdia Montes y Maria Cecibel Aguilar Morales. Por ser otros padres para mí, gracias.

A mis primos: Nixon Leonardo Azurdia Aguilar y Eduardo José Azurdia Aguilar. Por ser como unos hermanos para mí.

Índice general

Contenido	Página
Resumen	VI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Revisión de literatura	2
2.1.2 <i>El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala</i>	2
2.1.3 <i>Mejoramiento de cultivos vegetales</i>	2
2.1.4 <i>Cultivo de tejidos</i>	3
2.1.5 <i>Mutación</i>	5
2.1.6 <i>Agente mutagénico</i>	6
2.1.7 <i>Azida de sodio</i>	6
2.2 Descripción de la actividad de la empresa	8
3. Contexto de la práctica	11
3.1 Necesidad empresarial y eje de sistematización	11
3.2 Justificación	11
4. Objetivos	12
4.1 Objetivo general	12
4.2 Objetivos específicos	12
5. Plan de trabajo	13
5.1 Programa desarrollado	13
5.1.1 <i>Preparación de soluciones concentradas</i>	13
5.1.2 <i>Preparación de medios de cultivo</i>	15
5.1.3 <i>Esterilización de instrumentos de laboratorio</i>	16
5.1.4 <i>Desinfección superficial de explantes</i>	17
5.1.5 <i>Siembra de explantes</i>	17
5.1.6 <i>Subcultivo de explantes</i>	18
5.1.7 <i>Aplicación de tratamientos</i>	19
5.1.8 <i>Medición de la regeneración de plantas</i>	19
5.1.9 <i>Multiplificación de plantas</i>	19
5.1.10 <i>Aclimatación de plantas en invernadero</i>	20

5.2	Establecimiento del ensayo de Azida de Sodio	21
5.2.1	<i>Localización</i>	21
5.2.2	<i>Material experimental</i>	21
5.2.3	<i>Factor estudiado</i>	21
5.2.4	<i>Descripción de los tratamientos</i>	21
5.2.5	<i>Diseño e instalación del ensayo</i>	22
5.2.6	<i>Aplicación de los tratamientos</i>	23
5.2.7	<i>Variables de respuesta</i>	23
5.2.8	<i>Análisis estadístico</i>	23
5.3	Indicadores de resultado	24
5.4	Cronograma	25
6.	Resultados y discusión	26
6.1	Mortalidad de callos	26
6.2	Porcentaje de callos que regeneran plantas	27
6.3	Número de plantas por tratamiento	29
6.4	Número de plantas regeneradas por callo	30
7.	Conclusiones	32
8.	Recomendaciones	33
9.	Bibliografía	34
10.	Anexos	37
10.1	Otras actividades realizadas	37
10.1.1	<i>Cultivo de meristemas</i>	37
10.1.2	<i>Extracción de ADN</i>	38
10.1.3	<i>Extracción de ARN</i>	39
10.1.4	<i>Geles de agarosa</i>	41

Índice de tablas

No.	Contenido	Página
Tabla 1.	Soluciones stock para la elaboración de un medio de cultivo MS.	15
Tabla 2.	Descripción de los tratamientos evaluados.	22
Tabla 3.	Cronograma de actividades.	25
Tabla 4.	Análisis de varianza del porcentaje de mortalidad de callos.	26
Tabla 5.	Análisis de varianza del porcentaje de callos que regeneran plantas.	27
Tabla 6.	Análisis de varianza del número de plantas por tratamiento.	29
Tabla 7.	Análisis del número de plantas por callo.	30

Índice de figuras

No.	Contenido	Página
Figura 1.	Organigrama de CENGICAÑA.	10
Figura 2.	Stock de soluciones.	15
Figura 3.	Preparación de medio de cultivo MS.	16
Figura 4.	Cogollos de caña de azúcar.	17
Figura 5.	Siembra de discos foliares.	18
Figura 6.	Subcultivo de callos .	18
Figura 7.	Siembra de callos en medio de regeneración.	29
Figura 8.	Trasplante de plántulas a un medio con BAP.	20
Figura 9.	Trasplante de las vitroplantas regeneradas.	20
Figura 10.	Croquis de campo.	22
Figura 11.	Efecto de los tratamientos sobre la mortalidad de callos.	26
Figura 12.	Mortandad de callos a los 75 días de trasplantarse a un medio de regeneración.	27
Figura 13.	Porcentaje de callos que regeneran plantas.	28
Figura 14.	Regeneración de callos a partir de plantas.	28
Figura 15.	Número de plantas por tratamiento.	29
Figura 16.	Plantas regeneradas por tratamiento.	30
Figura 17.	Número de plantas por callo.	31
Figura 18.	Extracción de meristemas.	37
Figura 19.	Extracción de ADN.	39
Figura 20.	Macerado de tejidos con nitrógeno líquido.	40
Figura 21.	Integridad de ADN en geles de agarosa.	41

Evaluación del efecto de dosis de Azida de Sodio sobre la regeneración de callo en caña de azúcar

Resumen

El objetivo de la Sistematización de Práctica Profesional fue participar en el proceso de investigación sobre el efecto que tiene el compuesto mutagénico Azida de Sodio, sobre la regeneración en plantas en cultivo de tejidos de caña de azúcar para generar diversidad genética, en el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. El eje de sistematización consistió en evaluar el efecto de cada dosis de Azida de Sodio. El estudio se realizó utilizando la variedad CG 03-025, en CENGICAÑA, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla, en donde se evaluaron las dosis de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mM durante 15 y 30 minutos y un testigo en medio de regeneración líquido durante 15 y 30 minutos y un testigo absoluto sin tratamiento alguno. Se utilizó el diseño experimental completamente al azar, con once tratamientos y cuatro repeticiones. Las variables evaluadas fueron porcentaje de sobrevivencia de callos, porcentaje de callos que regeneran plantas y número de plantas regeneradas. Entre los resultados, el estudio indica que el mutagénico Azida de Sodio en las dosis evaluadas no manifestó ningún efecto estadísticamente significativo para las variables registradas. Se recomienda evaluar el compuesto Azida de Sodio a mayores concentraciones y/o tiempos.

1. Introducción

El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), implementó desde 1992, un programa de mejora genética, cuyo objetivo es aumentar la productividad del cultivo mediante el desarrollo de variedades mejor adaptadas para los ingenios azucareros. La biotecnología forma parte de este programa y mediante sus aplicaciones de cultivo de tejidos y marcadores moleculares contribuye al alcance del objetivo.

La variabilidad genética es la materia prima para cualquier programa de fitomejoramiento. Aunque la caña de azúcar es una planta alógama, el principal método de propagación es asexual, lo que limita la diversidad. Además, este cultivo tiene una base genética estrecha debido al origen en pocos genotipos que tienen todos los cultivares comerciales actuales.

Una de las técnicas utilizadas en fitomejoramiento para generar diversidad genética en plantas, es el uso de mutaciones inducidas, las cuales pueden obtenerse mediante el uso de agentes mutagénicos físicos o químicos. En cualquiera de los casos, se requiere establecer las dosis adecuadas, que permitan, por un lado, la inducción de mutaciones puntuales y por el otro la supervivencia de la mayor cantidad de plantas sometidas al procedimiento.

Este trabajo está enfocado en iniciar la exploración de la dosis adecuada del agente mutagénico Azida de Sodio, para la inducción de mutaciones con fines de mejora genética, mediante la medición del efecto de diferentes dosis del mutagénico, sobre la regeneración de plantas de caña de azúcar por cultivo de tejidos.

2. Antecedentes

2.1 Revisión de literatura

2.1.2 *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala.* En Guatemala, la caña de azúcar comenzó a cultivarse en 1536 en Amatitlán. Los primeros trapiches (molinos) se fundaron en el valle central de Guatemala y en el valle de Salamá durante el siglo XVI. En el siglo XVII creció el número de trapiches, estando los más importantes en manos de las órdenes religiosas. A mediados del siglo XIX Guatemala comenzó a exportar azúcar en cantidades menores. En 1960 Guatemala recibió su primera cuota de Estados Unidos, en ese tiempo, la producción total de azúcar de Guatemala fue de 68,000 toneladas métricas. Al expandirse las exportaciones de azúcar, los ingenios (haciendas para procesar caña de azúcar) introdujeron mejoras en el cultivo, la cosecha, la fábrica, la distribución y comercialización del producto, así como mejores condiciones de vida para los trabajadores de la agroindustria azucarera (CENGICANÍA, 2012).

La caña de azúcar forma parte de la familia de las *Poáceas* del género *Saccharum*, que tiene 6 especies, de las cuales 4 son domesticadas y 2 silvestres. Las domesticadas corresponden a *S. edule*, *S. barberi*, *S. sinensi* y *S. officinarum*; las silvestres *S. spontaneum* y *S. robustum* (Fiallos, 2008).

2.1.3 *Mejoramiento de cultivos vegetales.* El mejoramiento vegetal se encuentra presente en el desarrollo de la agricultura prácticamente desde el inicio de ésta y así es que las herramientas de este mejoramiento se han desarrollado hasta el día de hoy produciendo la inmensa gama de especies cultivadas que observamos. Si observamos de cerca la acción de mejoramiento que el ser humano aplica sobre los diferentes cultivos podremos reconocer dos tipos de mejoramiento:

A. *Mejora clásica:* El hombre se ha valido de cruzamientos, dentro o fuera de las especies, y mutaciones para obtener nuevos grupos vegetales de los que posteriormente seleccionará algunos con características específicas (Benites, 2005). Por esto se dice que este tipo de mejora se vale tanto de las mutaciones como de las recombinaciones (Fenoll & Gonzáles, 2010) para sus fines. Es importante aclarar que en este proceso de mejoramiento el intercambio o "movilidad" de genes es

abundante de tal forma que se obtienen plantas (mutantes o híbridos) donde los genes de las características que se buscan vienen acompañados de muchos otros que no están relacionados, necesariamente, con lo deseado por el mejorador (Covarrubias, 2009).

B. Mejora moderna: En este tipo de mejoramiento se debe aclarar que sólo se incluyen, según diversos autores, aquellas técnicas de biotecnología que actúan sobre características específicas del genoma del cultivo; se refiere también a la práctica de transgénesis llevado a cabo por la ingeniería genética. Aquí se salva el inconveniente presentado por la mejora clásica donde se obtenían individuos que junto con las características (genes) deseadas presentaban muchas otras que incluso podían resultar indeseables (Salas, 2015).

El mejoramiento de la caña de azúcar se ve limitado por la longitud de tiempo requerido para liberar una nueva variedad al comercio (10 a 14 años); y se ha enfocado en lograr la resistencia a plagas y enfermedades y en aumentar los rendimientos de sacarosa y biomasa. Con el fin de acelerar la mejora de este importante rubro, las investigaciones sobre el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar comenzaron en los años sesenta, y desde ese momento han sido establecidos diferentes sistemas de regeneración *in vitro* para muchas variedades comerciales (Alvez & Oropeza, 2015).

2.1.4 Cultivo de tejidos. El cultivo de tejido vegetal fue desarrollado a partir de la investigación de botánicos y fisiólogos vegetales desde 1950. Actualmente se ha convertido en una herramienta internacional importante en la selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de cosecha e involucra diferentes plantas en agricultura, horticultura, forestales y frutales. La ciencia del cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales los microorganismos se hacen crecer en medios estériles para la producción de microorganismos e identificación. Desde estas dos fuentes provino la tecnología por la cual las plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en gran número, o su crecimiento individual controlado, haciendo crecer pequeños trozos de tejido vegetal sobre una receta precisa de nutrientes en un recipiente estéril (Morgan, 2000).

La visión, el establecimiento del propósito y el potencial del cultivo de células y tejidos aislados se atribuyen al botánico alemán Gottlieb Haberlandt en el año 1902; sin embargo, no logró demostrar sus ideas en sus experimentos (Krikorian & Berqueman, 1996). El fundamento de la técnica reside en el concepto de la totipotencia celular, es decir, la capacidad que tiene una célula para dividirse y formar una planta completa. Philip Rodney, en los Estados Unidos, Roger Gautheret y Pierre Nobecourt, en Francia, durante la década de 1930, fueron los primeros que lograron el crecimiento de tejidos vegetales en cultivo, por períodos indefinidos de tiempo (Vasil, 2008).

El continuo crecimiento y división de células, que no se diferencian en ningún órgano o tejido específico, forma masas celulares a las que se les denomina callos. Heinz y Mee fueron los primeros en regenerar plantas a partir del callo en caña de azúcar. El callo se indujo en tejido de parénquima de brotes apicales, hojas e inflorescencias, usando un medio mineral base, al cual agregaron agua de coco (10%) y 2,4-D. La regeneración se obtuvo al transferir el tejido de callo a un medio sin 2,4-D (Molina & Melgar, 2012).

Castañeda *et al.* (2014) concluyen que:

Aunque la caña de azúcar produce semilla botánica que es usada para los programas de mejoramiento en sus fases tempranas, la principal forma de reproducción en variedades comerciales es vegetativa a través de yemas nodales y rizomas. Dada la factibilidad de reproducción vegetativa, la micropropagación ofrece un método fácil y rápido para la producción de vitro-plantas a gran escala, usando células y tejidos meristemáticos y no meristemáticos como explantes. Las plantas pueden ser regeneradas directamente a partir del explante (regeneración adventicia) o indirectamente a través de callos que se deriven de éste (regeneración *de novo*). En caña de azúcar es posible producir nuevas plantas a partir de regeneración directa, tanto de meristemas apicales como axilares, y también a partir de tejidos foliares inmaduros e inflorescencias.

Como sucede en la mayoría de las especies, las plantas de caña reproducidas *in vitro* a partir de meristemas mantienen mayor pureza genética y son fenotípicamente más estables que las que se producen a partir de callos. Por tanto, cuando se quiere generar variación somaclonal, se recomienda usar el cultivo de callos tanto a partir de hojas inmaduras como de inflorescencias. El cultivo de callos de caña de azúcar presenta una considerable variación de célula a célula y entre diferentes plántulas, debido principalmente a cambios en el cariotipo de los materiales generados.

La variación somaclonal es enorme y ofrece una oportunidad para el mejoramiento genético, ya que afecta caracteres tanto morfológicos (altura de planta o el color de tallo) como fisiológicos (producción de biomasa, rendimiento de azúcar o porcentaje de fibra). La variación somaclonal también sirve para identificar y seleccionar células y clones de caña de azúcar tolerantes a salinidad y a sequía, y puede generar variación adicional a la que se origina a través de mutagénesis. (pp. 19-20)

2.1.5 Mutación. La mutación inducida se ha convertido en una herramienta de gran impacto en programas de mejoramiento que complementan las estrategias convencionales. La principal ventaja de ésta es su habilidad para cambiar uno o algunos caracteres de cultivares sobresalientes, sin alterar todo el genotipo. Para generar mutagénesis en caña de azúcar se han usado rayos gama, etilmetanosulfonato, azida y nitrato de sodio (Castañeda *et al.*, 2014).

Una mutación puede ser considerada como un cambio brusco y hereditario en el genotipo de un individuo, dichas mutaciones, además, pueden causar en el genotipo alteraciones que sean minúsculas o imperceptibles (Font, 2000). Esta primera definición es coincidente con la formulada por Heros (1999), según la cual una mutación es el conjunto de cambios que ocurren de manera repentina en el organismo y que tienen la característica de ser heredables. Una mutación, además, puede tratarse de la alteración del ADN en una (o unas pocas) base conocida como mutaciones de punto, o puede darse el caso de pérdidas, adiciones o translocaciones de grandes porciones de ADN conocidas como mutaciones estructurales (Salas, 2015).

2.1.6 Agente mutagénico. La disponibilidad de las variaciones hereditarias es un requisito previo para la mejora genética de los cultivos. Donde no existe suficiente variación de forma natural, puede ser creada a través de cualquiera de los procesos, aleatorios o específicos. El tratamiento de materiales vegetales con mutágenos químicos o físicos es el enfoque más frecuente para la generación de nueva variación. Mientras que diversos mutágenos tienen diferentes efectos en los genomas de plantas, y se ha informado de algunos sesgos posicionales, irradiación y mutagénesis química generalmente se consideran mutagénesis aleatoria pues la ubicación de las lesiones del ADN no se pueden predecir eficazmente de antemano. El efecto de diferentes mutágenos en la secuencia de ADN también varía con el tipo de mutágeno y la dosis (Jankowicz, Kumlehn, Tai & Till, 2017).

La primera limitación para la aplicación de mutágenos es impuesta por el genoma preexistente. Una limitante adicional de esta técnica es que los mutágenos que se utilizan actualmente no pueden ser dirigidos a un gen específico. Los mutágenos afectan la estructura molecular del ADN, pero muchos de estos cambios inducidos pueden ser reparados antes de que se manifiesten como mutaciones génicas, translocaciones y otras aberraciones cromosómicas (Nomberto, 2011).

2.1.7 Azida de sodio. La Azida de Sodio es un preservante común para reactivos de laboratorios y es ampliamente usada en la industria de explosivos. Uno de los usos más comunes de este compuesto es en los airbags (bolsas de aire) que usan como mecanismo de seguridad los vehículos. A pesar de este uso cotidiano la Azida de Sodio presenta gran toxicidad pudiendo ser ingerida inhalada o absorbida a través de la piel (Sullivan & Krieger, 2001).

Según Heros (1999) la Azida de Sodio (NaN_3), o Azida Sódica, es un efectivo agente mutagénico del que es posible obtener una alta frecuencia de mutaciones con menor frecuencia de aberraciones cromosómicas. Estas características hacen de la Azida de Sodio no sólo un agente mutagénico efectivo sino también y, sobre todo, eficiente. Van Harten (1998) hace la misma

referencia sobre la eficiencia de la Azida de Sodio cuando menciona que este agente ocasiona, aparentemente, sólo mutaciones de punto con mínimas deleciones en un locus.

La Azida Sódica en soluciones ácidas es muy efectiva en la inducción a mutaciones clorofílicas y morfológicas (en pruebas con cebada) mientras que en soluciones alcalinas no es efectiva (Salas, 2015).

Sander y Muehlbauer (1977) comparan el efecto de la Azida de Sodio. Emplean una concentración de 0.001 M (en un medio de pH 3) del agente químico comparado con radiaciones de 5, 10 y 20 kR de rayos gamma. En los resultados se observaron aberraciones en las hojas de las plantas sometidas a radiación y no así en las tratadas con Azida de Sodio. Se determinó que la Azida de Sodio no causaba daño a nivel de cromosomas con esta dosis.

La mutagenicidad de Azida de Sodio está mediada a través de la producción de un metabolito orgánico de azida la fracción β -azidoalanina [$\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2) - \text{OOH}$]. El efecto mutagénico de NaN_3 depende del pH ácido de la solución de tratamiento. En la mayoría de los casos, los mutágenos químicos etil-metanosulfonato (EMS), N-metil-N-nitrosourea (MNU), o Azida de Sodio (NaN_3 , SA), han sido utilizados para realizar tratamientos en las plantas. Los mutagénicos químicos causan principalmente mutaciones puntuales que son irreversibles y se producen en densidades relativamente altas. Estos mutagénicos causan varios tipos de mutaciones: transiciones de punto, transversiones, deleciones y una relación relativamente baja en la frecuencia de las roturas cromosómicas que causan diversos reordenamientos cromosómicos (Jankowicz, *et al.*, 2017).

En una investigación sobre la inducción de mutaciones para la detección de resistencia a podredumbre roja (*Colletotrichum falcatum*) en caña de azúcar en la variedad CP 77-400, concluyen lo siguiente: El efecto del tratamiento de Azida de Sodio en la proliferación del callo y la regeneración de plantas, en los cultivos de control, 1.81 g de callo fue producido después de 12

semanas de incubación que en la regeneración produjo 57 plantas. Sin embargo, la incorporación de Azida de Sodio durante cinco días en el medio adversamente afectó la tasa de proliferación del callo y la regeneración de plantas, que se encontró, disminuyó con la concentración de Azida Sódica. Cuando la concentración de Azida de Sodio se aumentó de 0.1 mg / l a 5.0 mg / l la tasa de proliferación de callo se redujo en 8.8, 10.49, 26.52, 37.01 y 52.49 % en 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg / l de Azida de Sodio y el número de plantas regeneradas eran 48, 44, 38, 34 y 22 respectivamente. Se obtuvieron número máximo de variantes morfológicas a la concentración de 4.0 mg / l de Azida de Sodio. A esta concentración 19 plantas mostraron anomalías en el crecimiento (ya sea albino, viridis y hojas pequeñas). También se observó que todas las plantas morfológicamente anormales producidas (viridis o albino) debido al tratamiento mutagénico no sobrevivieron para seguir creciendo. Se obtuvieron 28 líneas con resistencia contra la enfermedad de la pudrición roja y caracteres morfológicos (Aamir, Shagufta, Sarwar & Javed, 2007).

En una investigación de cebada luego de analizar los datos, los investigadores concluyeron que:

La Azida de Sodio es un mutagénico muy eficiente en la cebada, así como en algunas otras especies de cultivos, las dosis de NaN_3 que se usan rutinariamente para el tratamiento mutagénico de semillas de cebada son por lo general dentro del intervalo de 0.5-4 mM durante 3-5 h. Casi todas las mutaciones que fueron identificadas eran cambios en la posición en las bases nitrogenadas (Jankowicz, *et al.*, 2017, p. 9).

2.2 Descripción de la actividad de la empresa

Las prácticas se realizaron en el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), ubicado en el km. 92.5 carretera al Pacífico, Finca Camantulul, del municipio de Santa Lucía Cotzumalguapa, en el departamento de Escuintla. Ubicado a $14^{\circ}15'31''$ de latitud norte y $91^{\circ}00'0.7''$ de longitud oeste a una altura de 300 msnm.

CENGICAÑA fue creado en 1992 para apoyar el avance tecnológico de la agroindustria azucarera, con el objetivo de mejorar la producción y la productividad del cultivo de la caña de azúcar y sus derivados. La organización del centro está constituida por varios programas y áreas. La práctica se desarrolló en el área de Biotecnología, que pertenece al Programa de Variedades.

Programa de Variedades. El programa contribuye con el incremento de la productividad de azúcar de la agroindustria azucarera guatemalteca a través del desarrollo de nuevas variedades de caña de azúcar. Estas variedades son de alto rendimiento de azúcar por unidad de área, resistentes a enfermedades y con características agroindustriales y adaptabilidad adecuadas a las diferentes condiciones ambientales de la zona cañera guatemalteca. Las áreas de trabajo del programa son: fitomejoramiento, fitopatología y biotecnología.

Área de Biotecnología. El área de Biotecnología hace uso de organismos vivos o de sus componentes para la obtención o modificación de productos o procesos útiles al hombre. La utilización de microorganismos responsables de procesos fermentativos es común desde hace miles de años. Más recientemente surge la biotecnología moderna, que comprende tres grupos de técnicas: cultivo de tejidos, marcadores moleculares e ingeniería genética. En CENGICAÑA utilizan técnicas de biotecnología moderna como herramientas que contribuyen en el proceso de mejoramiento genético de la caña de azúcar, a través del análisis de ADN y ARN para el diagnóstico de enfermedades, análisis de la diversidad genética, selección asistida con marcadores moleculares e identificación varietal (Cengicaña, 2017).

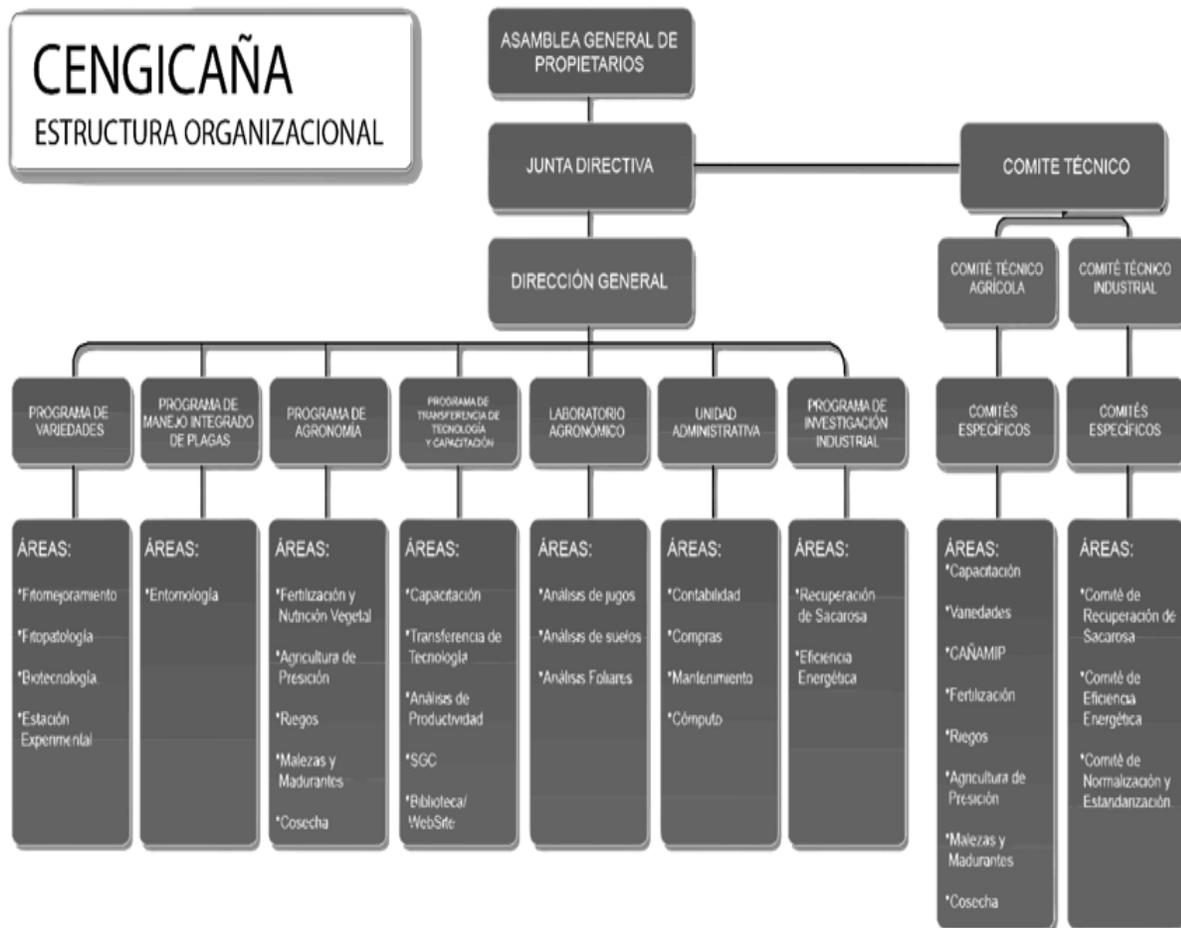


Figura 1. Organigrama del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (Cengicaña, 2017).

3. Contexto de la práctica

3.1 Necesidad empresarial y eje de sistematización

Uno de los factores que limita el mejoramiento genético en caña de azúcar que realiza el programa de variedades en CENGICAÑA es la poca variabilidad genética existente, lo que podría limitar la liberación de nuevas variedades para uso comercial. Por lo que, durante la práctica profesional, se apoyó en la evaluación del efecto de dosis de Azida de Sodio sobre la regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos de caña de azúcar.

3.2 Justificación

El cultivo de tejidos tiene varias aplicaciones, una de ellas es que se puede utilizar como vehículo para generar diversidad genética en un programa de mejora, mediante dos formas: variación somaclonal o la inducción de mutaciones en tejidos o células en cultivo. En el trabajo de la presente práctica se pretende evaluar el efecto que muestra un rango de dosis del compuesto Azida de Sodio, sobre la regeneración de plantas en tejidos cultivados de caña de azúcar variedad CG03-025, con el objetivo de inducir mutaciones. Este trabajo preliminar permitirá aplicar esta técnica para explorar el nivel de variabilidad que puede lograrse y la utilidad en el programa de desarrollo de variedades.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer una dosis apropiada para la inducción de mutaciones en callo de caña de azúcar con fines de mejora genética.

4.2 Objetivos específicos

1. Registrar el porcentaje de mortalidad de callos en cada dosis de Azida de Sodio.
2. Medir el porcentaje de callos que regeneran plantas en cada tratamiento.
3. Determinar la cantidad de plantas regeneradas en cada dosis evaluada.
4. Determinar la cantidad de plantas regeneradas por callo en cada tratamiento.

5. Plan de trabajo

5.1 Programa desarrollado

En la Práctica profesional se llevaron a cabo diferentes actividades con el objeto de evaluar el efecto de diferentes dosis del compuesto mutagénico Azida de Sodio, sobre la regeneración de plantas de caña de azúcar en cultivo de tejidos, con el fin de identificar una dosis apropiada que induzca mutaciones en el genoma de la caña, que puedan ser de utilidad en el proceso de mejora genética. Las actividades que se desarrollaron fueron:

5.1.1 Preparación de soluciones concentradas. Se apoyó en los cálculos y la preparación de soluciones concentradas.

Stock de Soluciones (para medios de cultivo):

Macroelementos 10X (1 l)

NH ₄ NO ₃ (Nitrato de Amonio)	=	16.5 g
KNO ₃ (Nitrato de Potasio)	=	19.0 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O (Cloruro de Calcio)	=	4.40 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O (Sulfato de Magnesio)	=	3.70 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de Potasio)	=	1.70 g

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

Microelementos 100X (1 l)

KI (Yoduro de Potasio)	=	0.083 g
H ₃ BO ₃ (Ácido Bórico)	=	0.620 g
MnSO ₄ (Sulfato de Manganeso)	=	1.280 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O (Sulfato de Zinc)	=	0.860 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibdato de Sodio)	=	0.025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Cobre)	=	0.0025 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de Cobalto)	=	0.0025 g

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

FE/EDTA 50X (1 l)

EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético)	=	1.86 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Hierro)	=	1.30 g

Aforar a 1 l.

Vitaminas de Gamborg 1000X (1 l)

Tiamina	=	0.1 g
Pyridoxol- HCl	=	0.05 g
Ácido Nicotínico	=	0.05 g

Diluir en 1 l de agua desmineralizada.

2,4-D Stock

Pesar 0.1 g de 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y diluir en 5 ml de alcohol, luego aforar a 200 ml con agua desmineralizada. Concentración final: 0.5 mg/ml.

BAP

Concentración final: 0.3 mg/ml

Disolver 0.06 g en 5 ml de KOH y aforar con 200 ml de agua desmineralizada.

Ácido Indolbutírico (AIB)

Concentración final: 0.5 mg/ml

Disolver 0.125 g en 5 ml de KOH 0.5 M y aforar a 250 ml de agua desmineralizada.



Figura 2. Stock de soluciones.

5.1.2 Preparación de medios de cultivo. Se elaboraron medios de cultivo MS con 2,4-D para la formación de callos a partir de discos foliares, sin 2,4-D para la regeneración de plantas, con BAP para la multiplicación de plantas y con AIB para la inducción de raíces.

Tabla 1

Soluciones stock para la elaboración de medio de cultivo MS básico

	2000 ml	1000 ml	500 ml
Sacarosa	60 g	30 g	15 g
Macroelementos	200 ml	100 ml	50 ml
Microelementos	20 ml	10 ml	5 ml
FE/EDTA	40 ml	20 ml	10 ml
Vitaminas B5	2 ml	1 ml	0.5 ml
Myo-inositol	0.4 g	0.2 g	0.1 g
Phytigel	4 g	2 g	1 g

Procedimiento para 1000 ml. En un beaker de 1000 ml se agregan 200 ml de agua desmineralizada, se mezclan los ingredientes anteriormente mencionados (menos el phytigel), luego en una probeta se mide el volumen y se afora a 1000 ml con agua desmineralizada. Se mide el pH a 5.7-5.8. Se vierte el medio en dos erlenmeyer, 500 ml en cada uno y se les agrega la cantidad correspondiente de phytigel a cada uno (1 g para 500 ml). Se tapan ambos erlenmeyer con papel aluminio y se esterilizan por 20 minutos.

Por último, se procede a verter en las cajas de Petri o frascos el medio, dejándolas semitapadas para eliminar el exceso de humedad.



Figura 3. Preparación de medio de cultivo MS, (a) medición de pH 5.7-5.8, (b) homogenización de la solución de phytigel, (c) esterilización de frascos.

5.1.3 Esterilización de instrumentos de laboratorio. Se esterilizaron todos los instrumentos con un autoclave durante 20 minutos, a una temperatura de 120°C a 18 psi.

5.1.4 Desinfección superficial de explantes. Se utilizó Hipoclorito de Sodio al 2.5 % para la desinfección. Al cogollo de caña de azúcar se le quitaron las hojas superficiales hasta dejarlo de un diámetro de 2 cm y de una longitud de 20 cm, luego se sumergieron en una probeta de 1000 ml con Hipoclorito de Sodio durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados con agua desmineralizada estéril. Luego de esto se dejó la probeta en la cámara de flujo laminar para proceder a obtener los discos foliares.

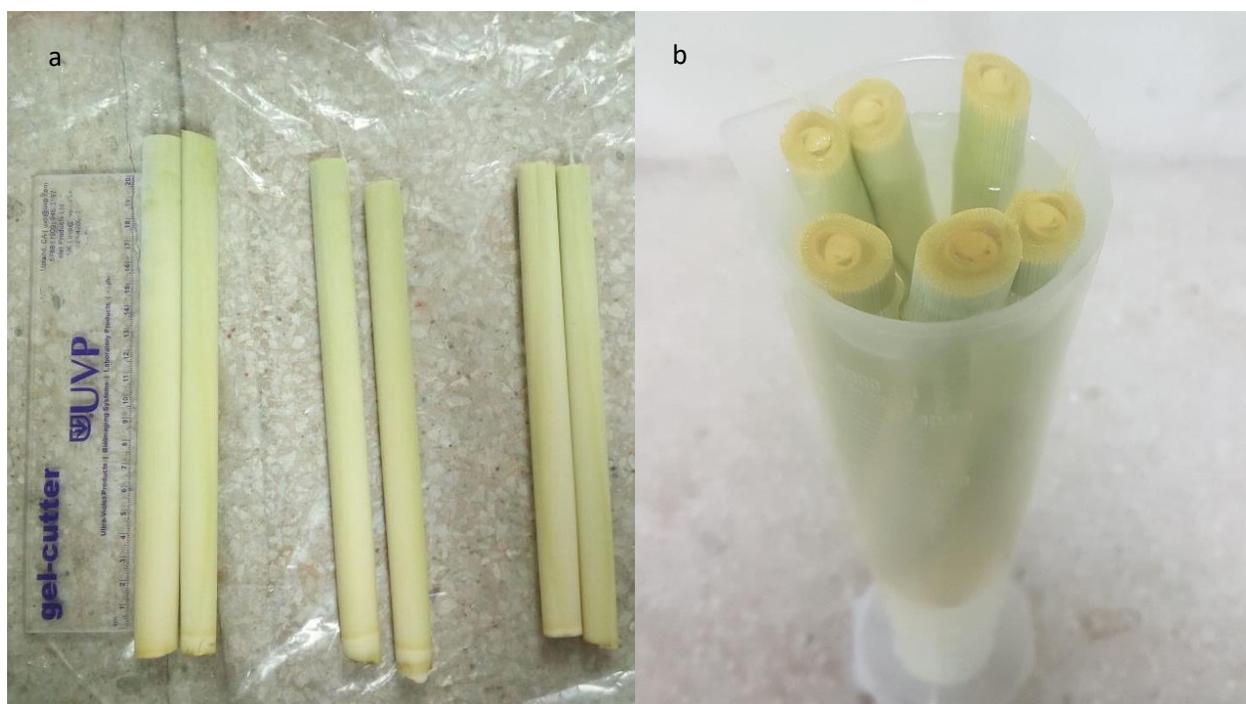


Figura 4. Cogollos de caña de azúcar (a) Tamaño de cogollos de caña de azúcar de 20 cm, (b) Desinfección de cogollos de caña de azúcar con Hipoclorito de Sodio.

5.1.5 Siembra de explantes. Para la extracción de discos foliares lo primero que se hizo fue quitar las hojas superficiales del cogollo hasta dejarlas entre 0.5 -1.0 cm de diámetro, ya que estas pueden estar contaminadas, luego se utilizó una caja Petri de vidrio estéril la cual sirvió como base para cortar y un bisturí número 12 para cortar los discos foliares descartando el primer disco foliar ya que puede estar contaminado, luego se sembraron en cajas Petri conteniendo medio MS con 2,4-D (3 mg/l) para la formación de callos. Los callos se formaron a las 12 semanas de sembrarse los discos foliares. Todo se realizó en la cámara de flujo laminar para evitar cualquier contaminación.



Figura 5. Siembra de discos foliares.

5.1.6 Subcultivo de explantes. Se apoyó en el subcultivo de explantes (callos) formados a partir de los discos foliares, lo que consistió en subdividir los callos con pinzas estériles para multiplicar el material del experimento, luego se sembraron en cajas Petri en un medio de cultivo MS con 2,4-D (3 mg/l). Todo esto se realizó en la cámara de flujo laminar para reducir la contaminación.

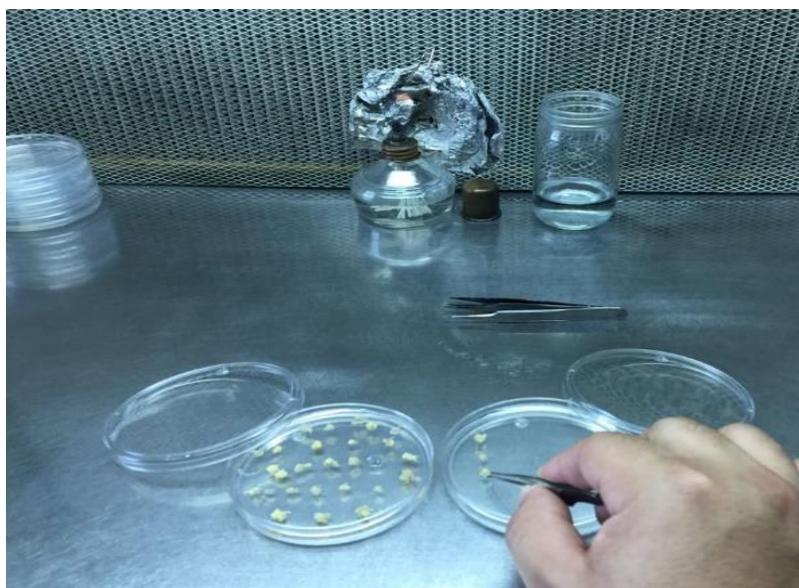


Figura 6. Subcultivo de callos.

5.1.7 Aplicación de tratamientos. Se aplicaron los distintos tratamientos de Azida de Sodio los cuales fueron: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mM durante 15 y 30 minutos, más el testigo 1 (15 minutos) y 2 (30 minutos) que se sumergieron en un medio de cultivo líquido de regeneración y el testigo absoluto que no se le aplicó ningún tratamiento sólo se sembró en un medio de regeneración. La aplicación se realizó de la siguiente manera. Se sumergieron los 220 callos distribuidos en 44 frascos los cuales tenían un medio de cultivo líquido con las dosis y tiempo anteriormente mencionados, luego los callos se pasaron a un medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. Todo esto se realizó en la cámara de flujo laminar para reducir la contaminación.



Figura 7. Siembra de callos en medio de regeneración.

5.1.8 Medición de la regeneración de plantas. Se realizó un conteo manual para comparar el porcentaje de callos que regeneran plantas, sobrevivencia de callos y número de plantas de cada tratamiento.

5.1.9 Multiplicación de plantas. Luego de finalizado el experimento, se preparó un medio con BAP (6-N-Bencilaminopurina) en el cual se trasplantaron las plantas regeneradas para inducir la multiplicación de plantas en medio de cultivo MS (ver cuadro 1) con 1.5 mg/l de BAP.



Figura 8. Trasplante de plántulas a un medio con BAP.

5.1.10 Aclimatación de plantas en invernadero. Se utilizó un invernadero de 4 x 4 m, donde las plántulas obtenidas se sembraron en bandejas multiceldas con sustrato Sunshine número 5. Las plántulas que se retrasaron en desarrollar raíz se trasplantaron a un medio de cultivo MS con AIB (Ácido Indolbutírico) a razón de 3 mg/l con el fin de inducir la formación de raíces.



Figura 9. Trasplante de las vitroplantas regeneradas.

5.2 Establecimiento del ensayo de Azida de Sodio

5.2.1 Localización. El ensayo se estableció en el laboratorio de biotecnología en el cuarto de variedades introducidas, en CENGICAÑA, ya que presenta las condiciones adecuadas para el desarrollo de los callos. Se encuentra en las coordenadas 14°15'31" de latitud norte y 91°00'0.7" de longitud oeste. La ubicación tiene una altura de 300 msnm. Se registra una temperatura de 21°C en el cuarto de variedades introducidas.

5.2.2 Material experimental. En el estudio se utilizaron discos foliares del cultivo de caña de azúcar de la variedad CG 03-025.

5.2.3 Factor estudiado. El factor estudiado fue la dosis de Azida de Sodio.

5.2.4 Descripción de los tratamientos. Para el ensayo se evaluaron once tratamientos, cuatro concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mM, durante 15 minutos y cuatro concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mM, durante 30 minutos, dos testigos sumergidos en un medio de cultivo líquido sin Azida de Sodio, el testigo 1 durante 15 minutos y el testigo 2 durante 30 minutos y un testigo absoluto sin tratamiento alguno. Los tratamientos evaluados se describen en el cuadro 2.

Tabla 2

Descripción de los tratamientos evaluados

Tratamiento	Ingrediente activo	Dosis (mM)	Tiempo
T ₁	Azida de Sodio	0.1	15 minutos
T ₂	Azida de Sodio	0.5	15 minutos
T ₃	Azida de Sodio	1.0	15 minutos
T ₄	Azida de Sodio	1.5	15 minutos
T ₅	Azida de Sodio	0.1	30 minutos
T ₆	Azida de Sodio	0.5	30 minutos
T ₇	Azida de Sodio	1.0	30 minutos
T ₈	Azida de Sodio	1.5	30 minutos
Testigo 1	Medio MS liquido		15 minutos
Testigo 2	Medio MS liquido		30 minutos
Testigo absoluto			

5.2.5 Diseño e instalación del ensayo. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 4 repeticiones. Cada uno de los tratamientos evaluados estuvo constituido por un total de 20 callos de caña de azúcar, distribuidos en cuatro repeticiones de 5 callos cada uno. En total, se distribuyeron 220 callos de caña de azúcar entre los 11 tratamientos.

Cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco de 50 x 100 mm. El croquis de campo se detalla en la figura 10.

Tratamientos										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
8	5	1	7	3	10	4	9	2	11	6
6	4	9	2	11	3	10	5	7	1	8
7	8	4	3	2	1	11	6	5	9	10

Figura 10. Croquis de campo.

5.2.6 Aplicación de los tratamientos. Los callos obtenidos a partir de segmentos de hoja fueron sumergidos en soluciones de Azida de Sodio en las concentraciones y tiempos anteriormente descritos. Esto se hizo en una cámara de flujo laminar bajo condiciones asépticas. Inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos, los callos fueron trasladados a medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, para promover la regeneración de plantas. Los frascos con callos fueron colocados en una incubadora con una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y un ciclo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

5.2.7 Variables de respuesta. Setenta y cinco días después de la aplicación de los tratamientos se midieron las siguientes variables:

- a) Porcentaje de sobrevivencia de callos.
- b) Porcentaje de callos que regeneran plantas.
- c) Número de plantas regeneradas

5.2.8 Análisis estadístico. Los datos que se obtuvieron fueron sometidos a un análisis de varianza mediante el programa estadístico INFOSTAT. No se hizo ninguna prueba de separación de medias en virtud que los cuadros de análisis de varianza no mostraron ninguna significancia.

5.3 Indicadores de resultado

- ***Siembra de 100 explantes foliares para la formación de callo:*** se sembraron 100 discos foliares en un medio de cultivo MS con 2,4-D para inducir la formación de callos, a las doce semanas después de la siembra de los discos foliares se formaron los callos, luego se realizó un subcultivo de callos para incrementar el material hasta obtener los 220 callos.
- ***Establecimiento de un experimento para evaluar dosis de azida de sodio:*** se estableció un ensayo para ver cómo se comportaban los tratamientos de Azida de Sodio, luego de esto se estableció el experimento con un total de 220 callos distribuidos en 44 frascos, para el que se utilizó un diseño completamente al azar con 11 tratamientos y cuatro repeticiones.
- ***Registro de variables de respuestas para la evaluación de los tratamientos de Azida de Sodio y análisis de los resultados.*** se determinó mediante un conteo manual el número de callos muertos (oxidados), el número de callos que regeneró plantas y el número de plantas regeneradas. Las primeras dos variables fueron expresadas en porcentaje.

5.4 Cronograma

El cronograma de actividades presenta las actividades desarrolladas durante los seis meses de práctica profesional. La cual se llevó a cabo desde el 14 de agosto de 2017 al 14 de febrero del 2018

Tabla 3

Cronograma de actividades desarrolladas durante la ejecución del proyecto, año 2017

	Semanas																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Plantilla y estructura del anteproyecto	X																										
Antecedentes		X																									
Redacción de objetivos			X																								
Justificación				X																							
Redacción de la revisión de literatura					X																						
Descripción de la empresa						X																					
Definición de los indicadores de resultados							X																				
Preparación de soluciones concentradas								X																			
Preparación de medios de cultivo									X																		
Esterilización de instrumentos de laboratorio								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Desinfección superficial de explantes										X																	
Siembra de explantes										X								X	X								
Formación de callos										X	X	X	X	X	X	X	X	X									
Subcultivo de explantes																		X									
Aplicación de tratamientos																			X								
Medición de la regeneración de plantas																					X						
Aclimatación de plantas en invernadero																						X					
Elaboración de informe final																							X	X	X	X	

6. Resultados y discusión

6.1 Mortalidad de callos

Para determinar la mortalidad de callos se realizó un conteo de aquellos que mostraron color café, luego se expresó en porcentaje. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (cuadro 4). La mortalidad de callos no tuvo diferencia significativa entre los tratamientos (p -Valor >0.05).

Tabla 4

Análisis de varianza para la variable porcentaje de mortalidad de callos

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-Valor
Modelo	2200	10	220	1.08	0.4021
Tratamientos	2200	10	220	1.08	0.4021
Error	6700	43	203.03		
Total	8900	43			

Los registros de mortalidad variaron en un rango entre cero y 30 por ciento, sin embargo, esta variación no es distinta estadísticamente (figura 11).

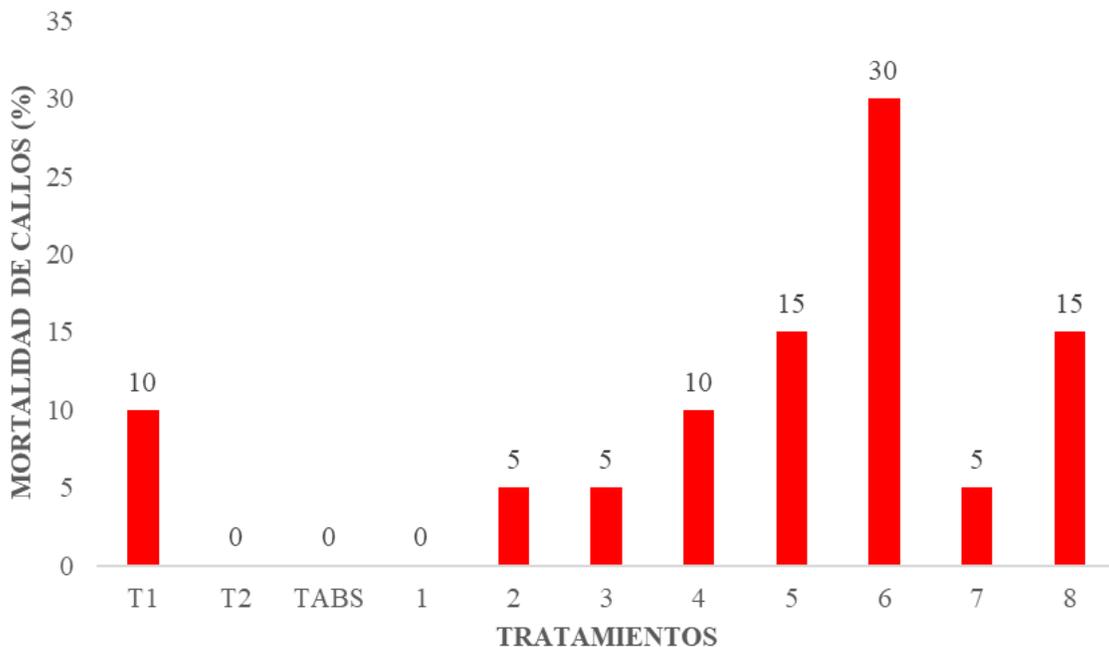


Figura 11. Efecto de los tratamientos sobre la mortalidad de callos.

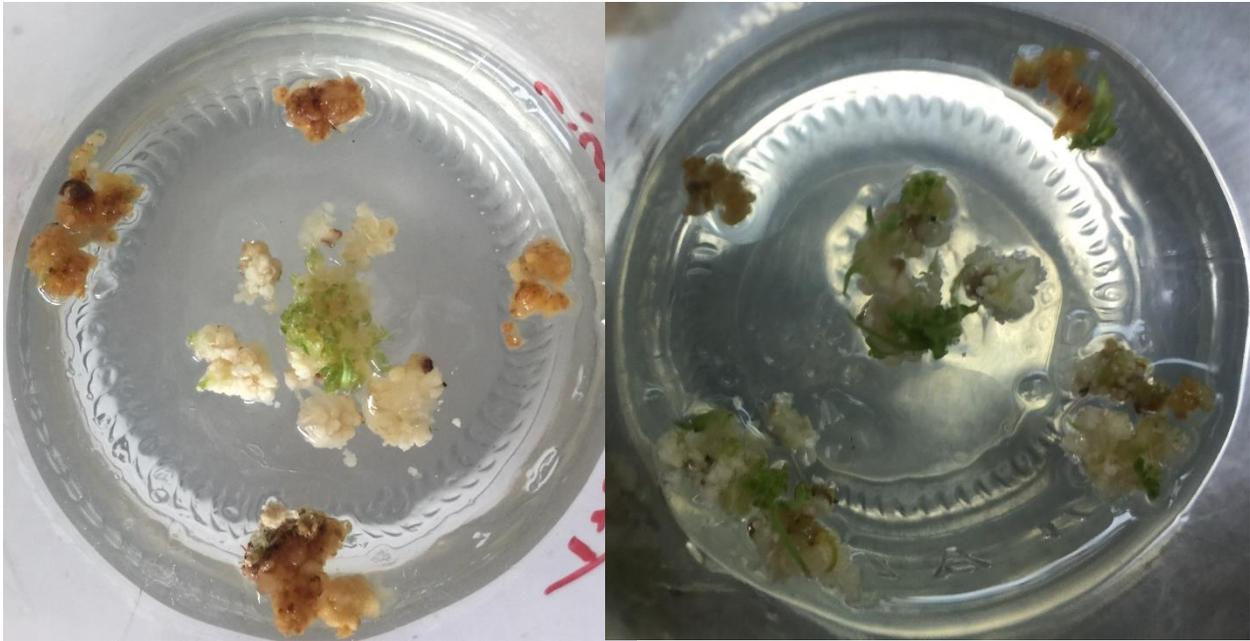


Figura 12. Mortalidad de callos a los 75 días de trasplantarse a un medio de regeneración.

6.2 Porcentaje de callos que regeneran plantas

Se realizó un conteo de los callos que mostraron formación de brotes y se expresó en porcentaje. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (cuadro 5). El porcentaje de callos que regeneran plantas no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos (p-Valor >0.05).

Tabla 5

Análisis de varianza para la variable porcentaje de callos que regeneran plantas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-Valor
Modelo	3218.18	10	321.82	1.42	0.2165
Tratamientos	3218.18	10	321.82	1.42	0.2165
Error	7500	33	227.27		
Total	10718.18	43			

El registro de callos que regeneraron plantas varió en un rango entre 70 para el tratamiento No. 6 y 100 por ciento para el tratamiento No. 1, testigo 2 y testigo absoluto (figura 12). Esta variación en los resultados es baja y no muestra diferencias significativas entre los tratamientos. Tampoco se evidencia un descenso en la regeneración de plantas que pueda asociarse con el aumento de dosis.

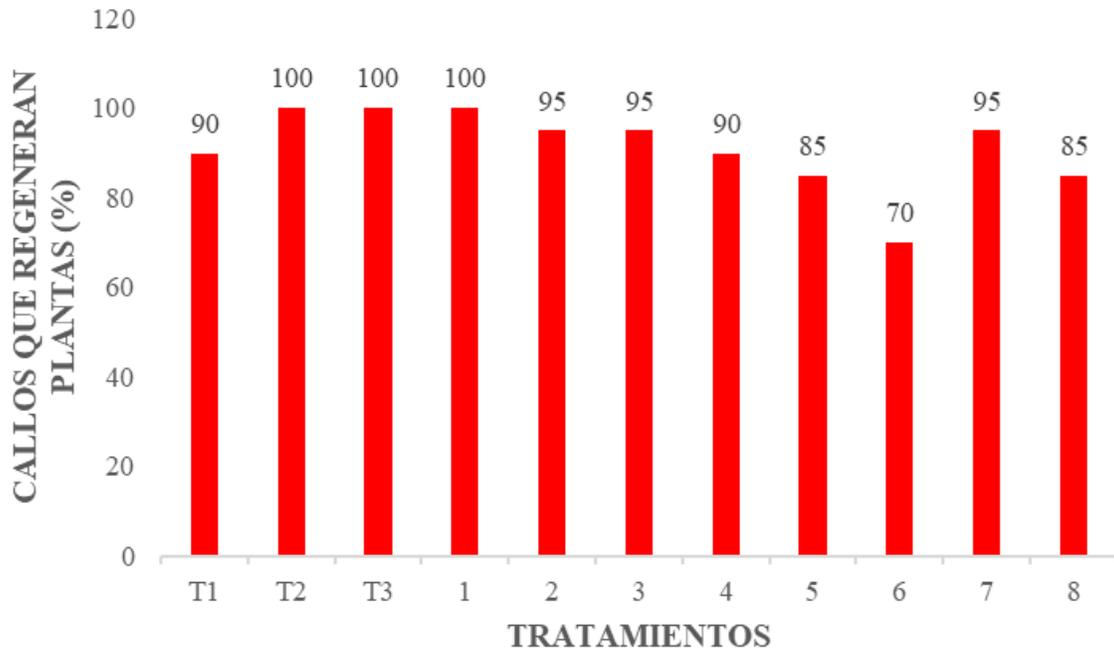


Figura 13. Porcentaje de callos que regeneran plantas.



Figura 14. Regeneración de plantas a partir de callos.

6.3 Número de plantas por tratamiento

Se determinó el número de plantas por tratamiento mediante un conteo al ser trasladadas a medio de multiplicación, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (cuadro 6). El análisis muestra que no hubo diferencia significativa (p -Valor >0.05) entre los tratamientos.

Tabla 6

Análisis de varianza para la variable número de plantas por tratamiento

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-Valor
Modelo	743.73	10	75.37	1.33	0.2536
Tratamientos	743.73	10	75.37	1.33	0.2536
Error	1864	33	56.48		
Total	2617.73	43			

El número de plantas regeneradas por tratamiento varió en un rango entre 12.5 para el tratamiento No. 4 y 28.75 para el testigo absoluto (figura 15). Esta variación, sin embargo, no manifiesta una dependencia de los tratamientos.

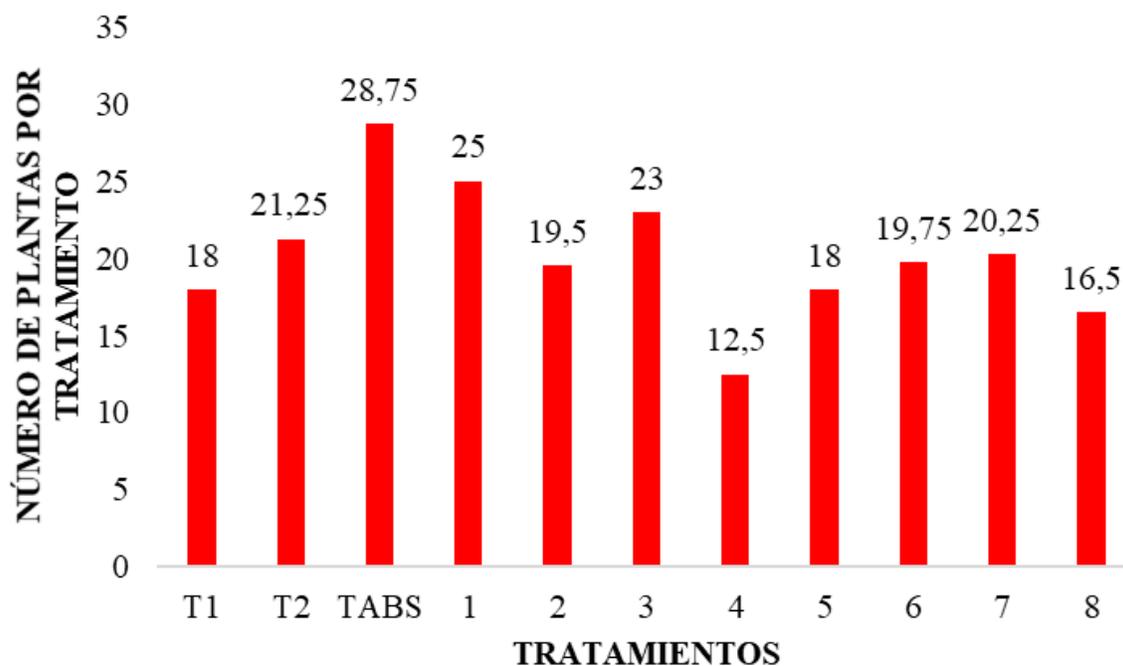


Figura 15. Número de plantas por tratamiento.

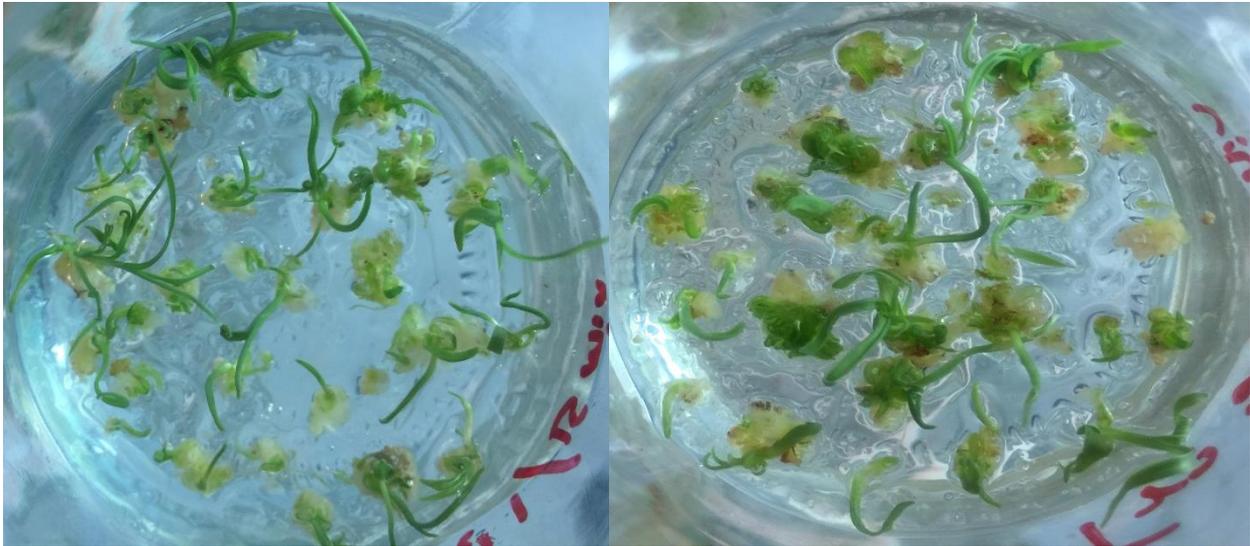


Figura 16. Plantas regeneradas por tratamiento.

6.4 Número de plantas regeneradas por callo

Se determinó el número de plantas por callo mediante la división de las plantas obtenidas en cada unidad experimental y dividiendo entre el número de callos que regeneró plantas. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (cuadro 7). El análisis muestra que no hubo diferencia significativa (p -Valor >0.05) entre los tratamientos.

Tabla 7

Análisis de varianza para la variable número de plantas por callo

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-Valor
Modelo	46.06	10	4.61	1.22	0.3127
Tratamientos	46.06	10	4.61	1.22	0.3127
Error	124.25	33	3.77		
Total	170.32	43			

El número de plantas regeneradas por callo varió entre 3 para el tratamiento No.4 y 7 para el tratamiento No.6 (figura 17). Esta variación no mostró estar asociada a los tratamientos.

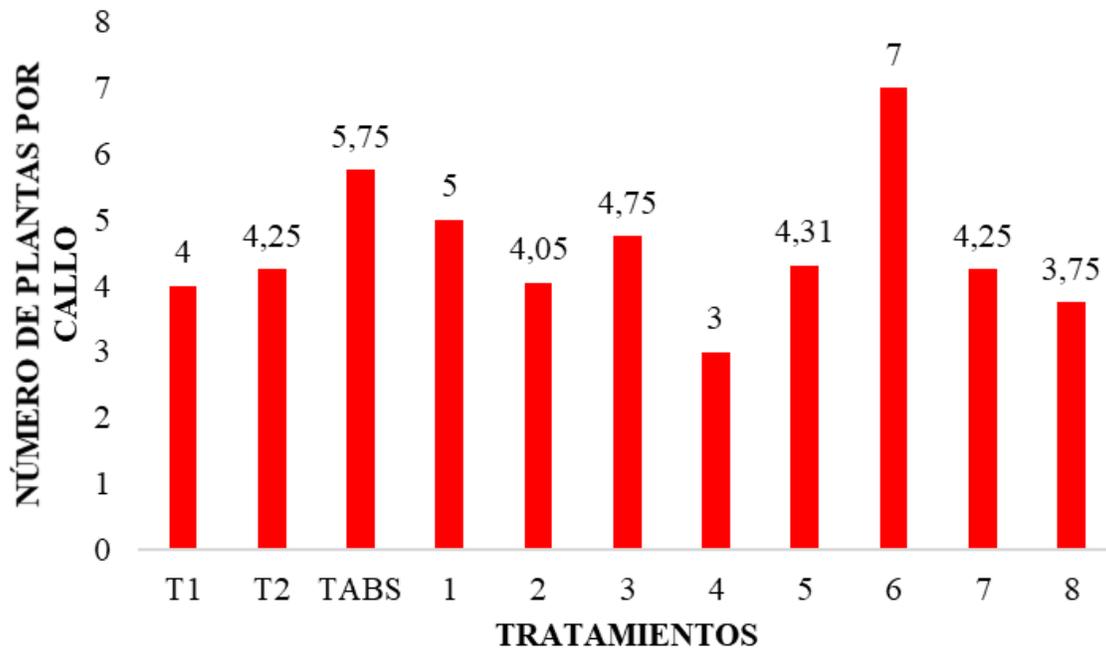


Figura 17. Número de plantas por callo.

7. Conclusiones

- Las dosis evaluadas del compuesto mutagénico Azida de Sodio, no mostraron diferencias significativas para la variable mortalidad de callos. Los valores registrados variaron entre cero para los tratamientos No. 1 y testigo 2 y 30 % para el tratamiento No. 6.
- Los tratamientos evaluados no presentaron diferencias estadísticas significativas en la variable porcentaje de callos que regeneran plantas. La regeneración varió entre 70 % en el tratamiento No. 6 y 100 % en el testigo 2, testigo absoluto y tratamiento No. 1.
- Las dosis evaluadas no mostraron efecto significativo sobre el número de plantas regeneradas por tratamiento. El menor valor (12.5) lo presentó el tratamiento No. 4, mientras que el mayor valor (28.75) lo mostró el testigo absoluto.
- La variable número de plantas por callo no mostró dependencia de las dosis evaluadas. El tratamiento No. 4 mostró el valor mínimo, regenerando en promedio 3 plantas por callo, en contraposición al tratamiento No. 6 que regeneró 7 plantas por callo.
- Considerando que el rango de dosis evaluadas de Azida de Sodio no mostró diferencias en las variables registradas, no es posible establecer en este trabajo, una dosis para ser utilizada en la inducción de mutaciones con fines de mejora genética de caña de azúcar.

8. Recomendaciones

- Se recomienda incrementar el tiempo de exposición del callo en el compuesto mutagénico Azida de Sodio.
- Se recomienda incorporar la Azida de Sodio al medio del cultivo sólido ya que permite en forma práctica, incrementar el tiempo de exposición del callo con el mutagénico.
- Se recomienda incluir otras variedades para determinar también el efecto del genotipo.
- Se recomienda incrementar la dosis o reducir el pH ya que la Azida de Sodio, es muy efectiva en soluciones ácidas.

9. Bibliografía

Aamir, A., Shagufta, N., Sarwar S. & JAVED I. (2007). *In vitro induced mutation for screening of red rot (Colletotrichum falcatum) resistance in sugarcane (Saccharum spp.)*.

Recuperado el 29 de agosto de 2017 de:

[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39\(6\)/PJB39\(6\)1979.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39(6)/PJB39(6)1979.pdf)

Alvez, B. & Oropeza, M. (2015). *Efecto de Dicamba y de ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre la embriogénesis somática en caña de azúcar*. Recuperado el 05 de agosto de 2017 de:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752015000200010

Benites, A. (2005). *Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas*.

España. Reverte.

Castañeda, O., Gómez, F., Trejo, L., Morales, V., González, M., Martínez, Y., Gámez, R. & Pastelín, M. (2014). *Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar*.

Recuperado el 04 de agosto de 2017 de:

https://www.researchgate.net/publication/273204624_Aplicaciones_del_cultivo_de_tejidos_vegetales_en_cana_de_azucar_Saccharum_spp

CENGICANA. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar.

(2017). *Programas*. Recuperado el 05 de septiembre de 2017 de:

<https://cengicana.org/programas/variedades>

CENGICANA. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar.

(2012). *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Recuperado el 19 de septiembre

de 2017 de: <https://cengicana.org/files/20170103101309141.pdf>

Covarrubias, A. A. (2009). *El mejoramiento clásico y moderno de cultivos vegetales. (parte I)*.

recuperado el 18 de septiembre de 2017 de:

http://www.acmor.org.mx/descargas/09_nov_17_vegetales.pdf

Fenoll, C. & Gonzáles, F. (2010). *Transgénicos*. Madrid. CSIC.

Fiallos, F. F. (2008). *Reacción de 100 variedades de caña de azúcar (Saccharum spp.) del banco de germoplasma del CINCAE, al carbón (Ustilago scitaminea Sydow), Roya (Puccinia melanocephala Sydow) y mosaico (Sugarcane Mosaic Virus) en la zona del cantón el Triunfo*. Recuperado el 08 de agosto de 2017 de:
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/5934/1/D-38956.pdf>

Font, P. (2000). *Diccionario de Botánica*. España: Ediciones Península.

Heros, E. (1999). *Mejoramiento genético de la kiwicha (Amaranthus caudatus L.), mediante la inducción de mutaciones*. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Jankowicz, J., Kumlehn, J., Tai, T. H. & Till, B. J. (2017). *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*. Suiza: Springer International Publishing.

Krikorian, A. & Berquam, D. (1969). *Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt*. Bot. Rev., 35:59-88.

Molina, L. & Melgar, M. (2012). *Biotecnología aplicada al cultivo de caña de azúcar en: El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*. Guatemala: Litografías modernas S.A.

Morgan, W. M. (2000). *International Plant Laboratories, Baltonsborough, UK*. Recuperado el 04 de agosto de 2017 de:
<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/CultivoTejidos.pdf>

Nomberto, C. A. (2011). *Identificación de polimorfismo de peroxidasas en callos de Saccharum spp. obtenidos por organogénesis somática empleando el 2,4-diclorofenoxiacético*. Recuperado el 06 de agosto de 2017 de:
<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5925/Tesis%20Doctorado%20-%20Carlos%20Nomberto%20Rodr%C3%ADguez.pdf?sequence=1>

Saenz, J. O. (2004). *Experiencias en la optimización de la maduración inducida, en el cultivo de la caña de azúcar (Saccharum spp.) en Guatemala*. Recuperado el 08 de agosto de 2017 de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2140.pdf

Salas, L. J. (2015). *La Azida de Sodio aplicada a las semillas de salvia (Salvia farinacea benth. var. blue bedder) para cambios genéticos*. Recuperado el 08 de agosto de 2017 de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1408/t007167.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sander, C. & Muehlbauer, F. (1977). *Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in Pisum*. Estados Unidos: Environmental and experimental botany.

Sullivan, J. & Krieger, G. (2001). *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.

Van Harten, A. (1998). *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*. Recuperado el 09 de octubre de 2017 de: https://books.google.com.gt/books?id=rXuj5R0pW_QC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Vasil, I. (2008). *A history of plant biotechnology: from the cell theory of schleiden and schwann to biotec crops*. Plant cell rep., 27:1423-1440.

10. Anexos

10.1 Otras actividades realizadas

10.1.1 Cultivo de meristemas. Con el propósito de aprovechar el material de variedades que tienen enfermedades de cuarentena en el país tales como: el virus del amarillamiento, fiji, raquitismo, escaldadura foliar y el virus del mosaico de la caña de azúcar, se realizó el cultivo de meristemo, el cual consiste en aislar asépticamente la región meristemática e implantarla en un medio de cultivo estéril con el propósito de inducir la diferenciación de células y tejidos en plantas completas, con el fin de eliminar enfermedades víricas y bacterianas anteriormente mencionadas y producir plantas sanas.

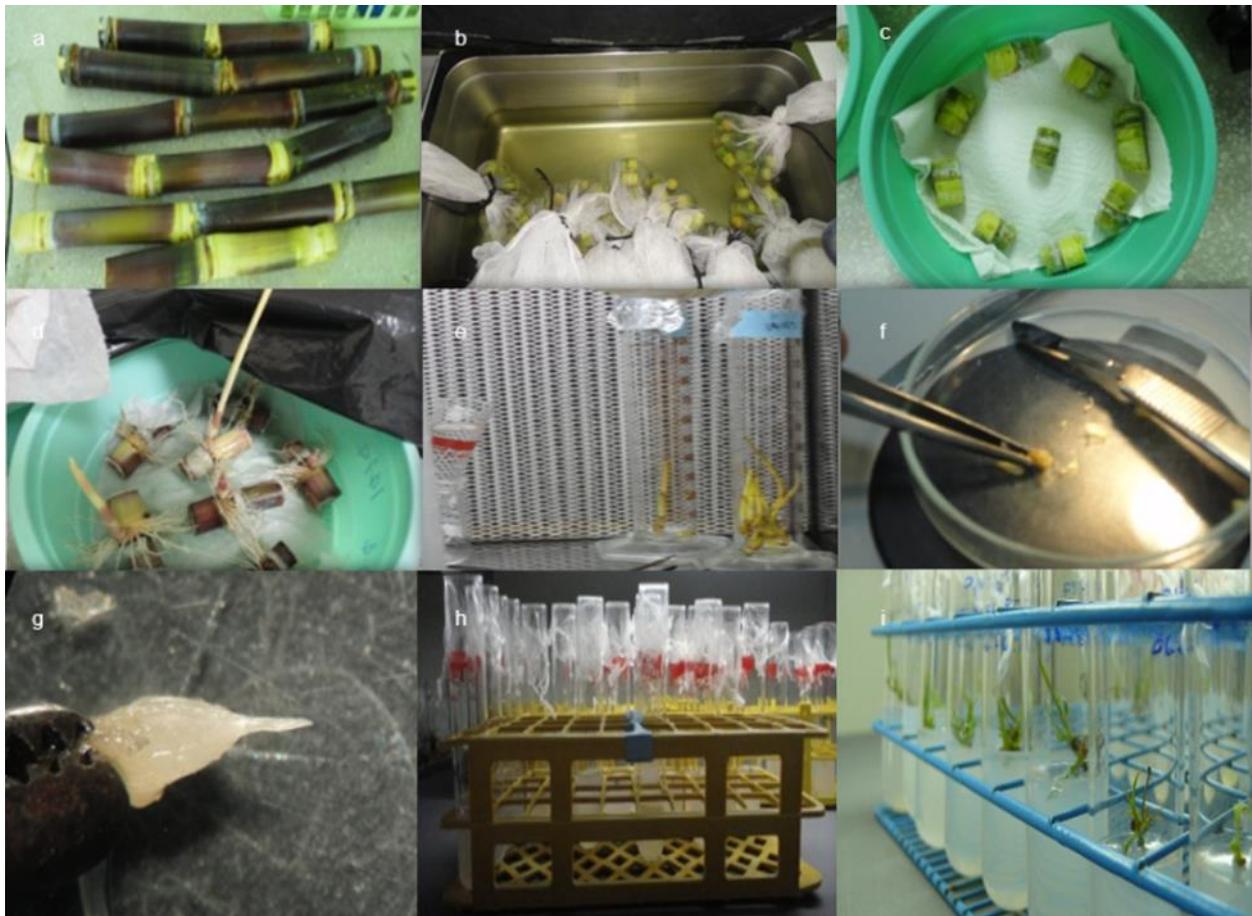


Figura 18. Extracción de meristemas. (a) tallo de caña, (b) tratamiento térmico, (c) corte de yemas, (d) germinación de yemas, (e) desinfección de yemas con hipoclorito de sodio, (f) eliminación de hojas, (g) extracción de meristemo, (h) siembra de meristemo en medio ms de regeneración, (i) regeneración de plantas.

10.1.2 Extracción de ADN. Se colaboró en la extracción de ADN de 400 variedades de caña de azúcar para ser utilizado en estudios de secuenciación genómica. También se realizaron otras extracciones de ADN para identificación varietal. La extracción de ADN consta de dos etapas que son: lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido, y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de los elementos que pueden interferir en la PCR.

Protocolo de extracción propuesto por Da Silva (2003) modificado por CENGICAÑA (2012).

1. Tomar 150 mg de material vegetal y macerarlo con nitrógeno líquido dentro de un tubo de 1.5 ml (mini-preps) hasta que este se convierta en polvo fino, luego agregar 600 µl de buffer CTAB precalentado a 65 °C. (evitar agregar el buffer a menos de 15 °C).
2. Cerrar el tubo y mezclar vigorosamente.
3. Incubar los tubos en baño María por 30 minutos, mezclando ocasionalmente.
4. Remover los tubos del baño María y enfriar a temperatura ambiente; cuando esté a temperatura ambiente agregar 500 µl de cloroformo: isoamilico (24:1); mezclar por 10 minutos.
5. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos.
6. Transferir la fase superior a un tubo nuevo.
7. Repetir el lavado con Cloroformo: isoamilico del paso 4 al 6 pero esta vez centrifugar únicamente 5 minutos.
8. Agregar 15 µl de ARNasa a cada tubo e incubar a 37 °C por 30 minutos.
9. Agregar 2.5 volúmenes de isopropanol frío y 1/10 de Acetato de amonio y mezclar hasta formar un precipitado.
10. Almacenar a -20 °C por 15 minutos.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos, descartar fase líquida.
12. Lavar el pellet con 335 µl de Etanol al 70%, centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos.
13. Lavar el pellet con 335 µl de Etanol puro, centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos.
14. Descartar la fase acuosa y secar sobre la mesa por 30 minutos.

15. Disolver el ADN en buffer TE e incubar a 37 °C por 15 minutos.
16. Almacenar a 4 °C.

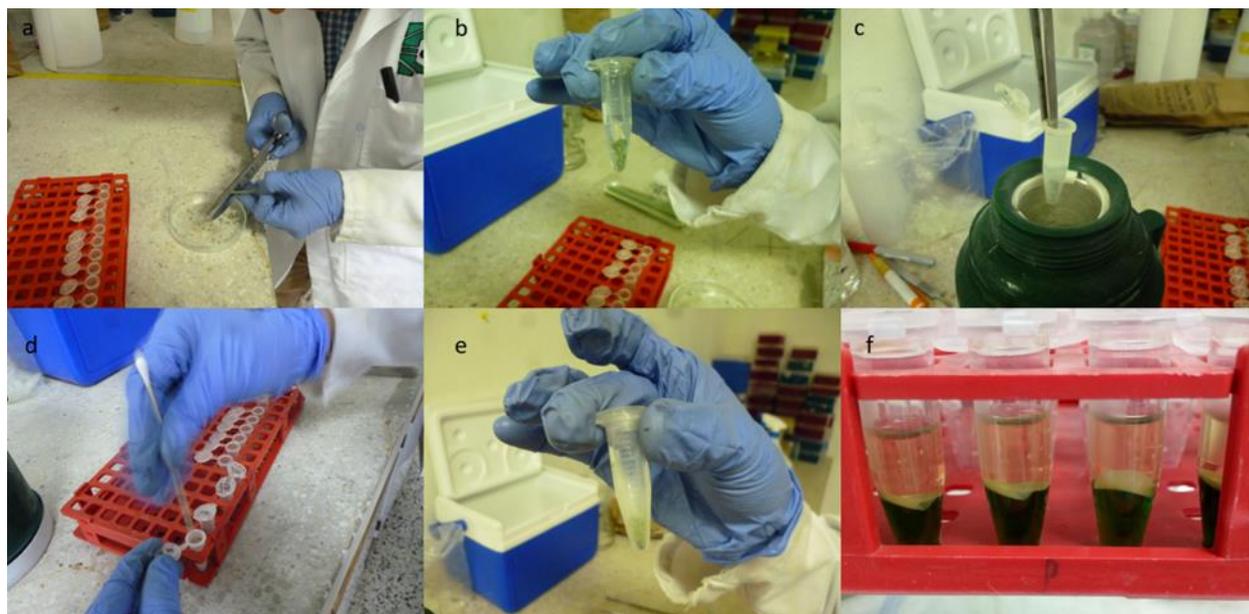


Figura 19. Extracción de ADN. (a) corte de tejido, (b) tejido en tubo de 1.5 ml, (c) aplicación de nitrógeno, (d) macerado de tejido, (e) tejido macerado, (f) separación de la fase acuosa de las proteínas y la fase fenólica.

10.1.3 Extracción de ARN. Se colaboró en la extracción de ARN de caña de azúcar. Este ARN fue cuantificado mediante lecturas de absorbancia de luz a una frecuencia de 260 nm. Los resultados serán utilizados por el Programa de Malezas y Madurantes de CENGICAÑA, para determinar si existe correlación en la cantidad de ARN aislada, con relación al estímulo que la planta recibe para florear. El objetivo final es lograr incrementar la eficiencia en las aplicaciones de inhibidores de la floración.

Protocolo para la extracción de ARN (Locali et al. 2003) modificado para caña de azúcar por CENGICAÑA (2012).

1. En un tubo de 1.5 ml pesar 0.1 g de tejido vegetal fresco.
2. Sumergir el tubo en nitrógeno líquido y pulverizar el tejido utilizando un palillo de madera estéril.
3. Agregar 500 μ l de tampón de lavado y agitar con vortex.

4. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm. Descartar el sobrenadante, agregar 600 μ l de tampón de extracción y agitar con vortex. Incubar a 55 °C con agitación constante por 30 minutos.

5. Agregar 400 μ l de FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL y agitar con vortex. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm.

6. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo y agregar 1 volumen de ISOPROPANOL frio y 0.1 volúmenes de ACETATO DE AMONIO 7.5 M. Mezclar bien e incubar a -20 °C al menos 15 minutos.

7. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm. Descartar el sobrenadante y agregar 100 μ l de ETANOL AL 70% sobre el pellet. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm.

8. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado al aire. Resuspender en 25 μ l a 50 μ l de AGUA ULTRAPURA.



Figura 20. Macerado de tejido con nitrógeno líquido.

10.1.4 Geles de agarosa. Se apoyó en la elaboración de geles de agarosa para determinar la integridad del ADN que se extraía de cada muestra

• Procedimiento.

1. Se prepara el gel mezclando 0.8 g de Agarosa con 40 ml de solución TAE 1X y calentando esta hasta que la agarosa se diluya completamente.
2. Verter la solución anterior en la cámara de gel previamente preparada con el tape en ambos lados posteriormente colocar el peine y dejar que solidifique.
3. Luego con mucho cuidado retirar el peine y el tape de ambos lados y colocar dentro de la cámara de electroforesis con solución TAE 1X.
4. Sobre la tira de parafilm se coloca 1 µl de buffer de carga por muestra.
5. Tomar 5 µl de muestra y mezclar pipeteando con el buffer de carga que se colocó sobre el parafilm.
6. Luego tomar la muestra y colocarla en uno de los pozos del gel.
7. Una vez cargado el gel, cerrar la cámara de electroforesis y prender la fuente de poder.
8. Luego colocar 90 voltios durante 45 minutos.
9. Por último, observar sobre luz ultravioleta y anotar los resultados.

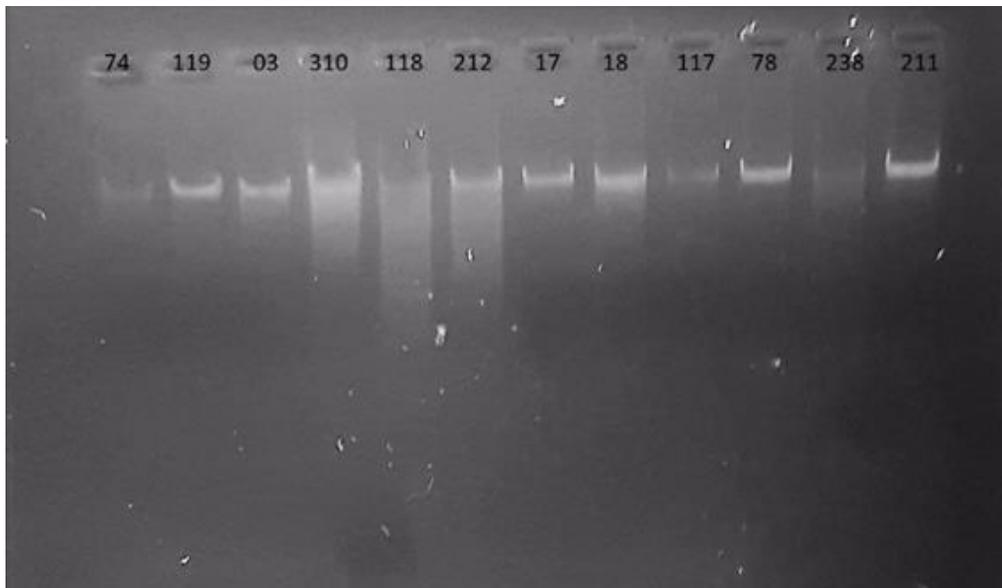


Figura 21. Integridad de ADN en geles de agarosa.