

**Evaluación de tres medios de cultivo en enraizamiento de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*) por Sistema de inmersión temporal**

Yuli Viviana Sarria

Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD

Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio ambiente - ECAPMA

Programa de Agronomía

Palmira

2022

**Evaluación de tres medios de cultivo en enraizamiento de caña de azúcar
(*Saccharum officinarum*) por Sistema de inmersión temporal**

Yuli Viviana Sarria

Trabajo para optar al título de **Agrónomo**

Director:

Ph.D. Sandra Patricia Montenegro Gómez

M. Sc Juan Carlos Ángel Sánchez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD

Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio ambiente - ECAPMA

Programa de Agronomía

Palmira

2022

Página de Aceptación

Ph.D. Sandra Patricia Montenegro Gómez

Director Trabajo de Grado

Jurado

Jurado

Dedicatoria

A Dios esta oportunidad, porque es él quien me dio la oportunidad de estar aquí, la sabiduría, la resiliencia, fuerzas y compañía cuando sentía que no había salida.

Cuando miras alrededor y te das cuenta que no estás solo que hay que seguir, aunque parezca que el tiempo no alcanza, en el camino largo y aunque la luz no se ve al final del túnel, por el tiempo que no se pudo compartir quiero dedicarles este trabajo, es de ustedes que lo son todo en mi vida Yilmer, Yulissa y Yilmer.

También quiero dedicar este trabajo a mi abuela es una persona muy importante en cada etapa de mi vida y a mis demás familiares, amigos y compañeros por lo que hemos vivido en mis etapas de formación.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi **esposo** y mis **hijos** por la compañía durante este proceso, por ser incondicionales dándome su apoyo, comprensión y afecto para lograr cumplir esta meta.

Agradecer a mis familiares, madre, hermanos, abuela, tíos, primos y amigos que de alguna manera han contribuido antes en el fortalecimiento de mi vida para llevar a cabo este trabajo. Estoy eternamente agradecida con todos, Dios les multiplique.

Agradecer al M.Sc **Juan Carlos Ángel Sánchez** por su confianza en el trabajo, paciencia y ayuda en mi proceso de formación y el desarrollo de mi trabajo.

De manera especial agradecer a M.Sc **Claudia Echeverri Rubiano** por compartirme sus conocimientos, su tiempo dedicado, paciencia, por ser mi guía con el buen ejemplo y calidad de su trabajo.

Agradecer a **Jenifer Daniela Botina Montealegre** siendo compañera de trabajo y universidad es una amiga que ayudo dándome palabras de apoyo, su tiempo de compañía para la realización de este trabajo hasta el final.

Eternamente agradecida con la profesora **Sandra Patricia Montenegro** Ph.D por la paciencia y entrega, a veces tenemos momentos donde nos parece difícil el proceso, pero ella con su frase “vos podés” me ayudaba y animaba a seguir, gracias.

También quiero agradecer a Cenicaña por brindarme los recursos y herramientas necesarias para realizar el proceso de investigación.

A M.Sc **Héctor Alberto Chica Ramírez** gracias por su tiempo que me llenó de mucho aprendizaje en todas las etapas de este trabajo.

A **Roció del Pilar Barrios** por todas las enseñanzas y ayudarme en mi crecimiento personal y control emocional, gracias por todo, Dios la bendiga.

Sindy Henao, ella una mujer inspirada en la berraquera, aunque fue corto su tiempo, pero sus ocurrencias fueron suficientes para hacer del trabajo un paseo.

A todos los compañeros de trabajo del área de fitopatología, los de servicios generales, superintendencia, y otras áreas que de alguna manera han contribuido antes y durante el proceso para llevar a cabo este trabajo, siendo como guía y acompañamiento. Estoy eternamente agradecida con todos, Dios les bendiga.

Eternamente agradecida con los profesores y la universidad UNAD por la paciencia y entrega, a veces tenemos momentos donde nos parece difícil el proceso, pero cada profesor con su entrega me animaba a seguir, siempre gracias.

Sé que no cité a algunas personas aquí porque son muchas las que hemos realizado este camino de aprendizaje a ustedes y a los citados Dios me los bendiga, el universo les multiplique.

Resumen

Con el fin de evaluar el efecto de la densidad de siembra sobre variables asociadas al desarrollo radicular (longitud y materia seca) en cultivo *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la variedad CC 05-430, bajo el sistema inmersión temporal (SIT), se realizó este experimento donde se usaron tres medios de cultivo: M1, M2, M3 y un testigo (T). Todos los medios de cultivo en diferentes proporciones estuvieron compuestos por los reactivos sacarosa, ácido cítrico, carbón activado, Ácido 1-naftalenacénico-NAA, Kinetina, Sales MS y Myo-Inositol. Las densidades de siembra fueron evaluadas en el medio Cenicaña a razón 50 y 90 plantas/biorreactor. Los resultados obtenidos indicaron que la densidad de siembra no afectó el desarrollo de raíces en la variedad, por lo cual, en las pruebas de los medios de enraizamiento se usó la densidad de 90 la cual hace más eficiente el sistema. Los medios de enraizamiento mostraron estadísticamente mayor eficiencia en longitud y número de raíces en M2 y M3, el peso seco de la raíz fue mayor en M3 el cuál contenía 50 gramos de sacarosa mientras los demás medios solo eran 25 gramos, adicionalmente M3 no contenía kinetina, por lo que podría concluirse que la cantidad de azúcar adicionada al medio de cultivo bajo SIT influyó en el desarrollo radicular de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), en la variedad CC 05-430; adicionalmente, se recomienda la exclusión de la fitohormona kinetina, que sin ser adicionada en el M3 no afectó las variables evaluadas.

Palabras claves: Sistema de inmersión temporal, desarrollo radicular, densidad de siembra, caña de azúcar, cultivo *in vitro*.

Abstract

In order to evaluate the effect of seeding density on variables associated with root development (length and dry matter) in *in vitro* culture of sugarcane (*Saccharum officinarum*) in the CC 05-430 variety, under the temporary immersion system (SIT) this experiment was carried out where three culture media were used: M1, M2, M3 and a witness (T). All culture media in different proportions were composed of the reagents sucrose, citric acid, activated carbon, 1-naphthalene-NAA acid, Kinetin, MS salts and Myo-Inositol. The planting densities were evaluated in the Cenicaña medium at a rate of 50 and 90 plants/bioreactor. The results obtained indicated that the planting density did not affect the development of roots in the variety, therefore, in the tests of the rooting media, the density of 90 plants was used, which makes the system more efficient. The rooting media showed statistically greater efficiency in length and number of roots in M2 and M3, the dry weight of the root was greater in M3 which contained 50 grams of sucrose while the other media were only 25 grams, additionally M3 did not contain kinetin, so it could be concluded that the amount of sugar added to the culture medium under SIT influenced the root development of sugar cane (*Saccharum officinarum*), in the variety CC 05-430; additionally, the exclusion of the phytohormone kinetin is recommended, which without being added in the M3 did not affect the variables evaluated.

Keywords: Temporary immersion system, root development, planting density, sugar cane, *in vitro* culture.

Tabla de contenido

Lista de figuras.....	12
Lista de tablas.....	13
Lista de anexos.....	14
Introducción.....	15
Problema.....	19
Justificación.....	20
Objetivos.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
Marco teórico.....	22
Caña de azúcar (Saccharum officinarum).....	22
Taxonomía.....	22
Morfología.....	24
Raíz.....	24
Tallo.....	26
Hojas.....	27

	10
1.1.1. Meristemo apical.....	27
1.2. Métodos de propagación.....	28
1.3. Cultivo <i>in vitro</i> (meristemas)	28
1.4. Sistemas de propagación de la caña de azúcar por cultivo <i>in vitro</i>	31
1.5. Medios de cultivos.....	32
2. Metodología.....	35
2.1. Localización.....	35
2.2. Obtención del material vegetal.....	36
2.3. Fase de laboratorio	36
2.4. Ensayo para evaluar dos densidades de siembra en la variedad CC 05-430 de caña de azúcar.	40
2.5. Evaluación de medios de cultivos.....	42
3. Análisis estadístico.....	44
4. Resultados y discusión.....	45
4.1. Densidad de plantas por biorreactor de caña de azúcar en la variedad CC 05-430	
45	
4.2. Medios de enraizamiento para caña de azúcar en la variedad CC 05-430.....	46

5. Conclusiones.....53

6. Referencias.....54

7. Anexos.....64

Lista de figuras

Figura 1. Proceso de producción de plantas por cultivo <i>in vitro</i>	31
Figura 2. Mapa de ubicación de Cenicaña.....	35
Figura 3. Proceso de enrizamiento por el SIT en plantas de caña de caña de azúcar. 36	
Figura 4. Sistema de Inmersión temporal - Rita con meristemas elongación	38
Figura 5. Cantidad de raíces, longitud de raíces, longitud de la planta y longitud del tallo de la variedad CC 05-430. Empleando 50 y 90 plantas por biorreactor bajo el SIT durante 30 días empleando el medio de enraizamiento Cenicaña	45

Lista de tablas

Tabla 1. Medios de cultivos para la elongación de los meristemas y multiplicación de las plantas.	39
Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para el enraizamiento en la variedad CC 05-430 por cultivo <i>in vitro</i> en el SIT.	41
Tabla 3. Efecto de los medios de cultivo en cada una de las variables evaluadas en la variedad CC 05-430 en el sistema de inmersión en el enraizamiento <i>in vitro</i> de las plantas.	46

Lista de anexos

Anexo 1. Medios de cultivo con los componentes y cantidades.	64
Anexo 2. Graficas de los medios de enraizamiento según las variables evaluadas del desarrollo de raíces.	64
Anexo 3. Variables de evaluadas para el desarrollo de la planta en los medios de enraizamiento.	65
Anexo 4. Análisis de varianza.	65

Introducción

La Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un cultivo que se utiliza como recurso natural, de gran uso a nivel mundial, del cual se puede obtener azúcar, panela y diferentes subproductos con sostenibilidad ecológica. Las melazas, son el principal subproducto, siendo la materia prima para las industrias del alcohol y sus derivados, así mismo, el bagazo es usado para la producción de papel y la generación de energía (Betancourt, 2017).

A nivel mundial, se encuentran 121 países productores de caña de azúcar, donde los 15 países con mayor producción son Brasil, India, China Tailandia, Pakistán, México, Cuba, Colombia, Australia, USA, Filipinas, Sudáfrica, Argentina, Myanmar y Bangladesh, concentrando el 86.0% de área y una producción total de 1333 millones de toneladas métricas. (Ojeda, 2014). En Colombia estos cultivadores se encargan de abastecer a 13 ingenios de la región azucarera La Cabaña, Carmelita, Cauca, Manuelita, María Luisa; Mayagüez, Occidente, Pichichi, Providencia, Risaralda, Riopaila castilla y Sancarlos. (Procaña, 2015). Con 241,994.39 hectáreas sembradas en el sector (informe anual 2020).

En Colombia el avance de la investigación y la tecnología en el cultivo de la caña ha ampliado el portafolio de productos a la cadena de producción, entre ellos se encuentran: azúcar, mieles, alcohol industrial, alcohol potable, alcohol carburante, energía eléctrica, preparaciones alimenticias, abonos orgánicos (Asocaña 2006-2007), debido a la capacidad de producción del sector, se requiere elevar los volúmenes de producción e introducir nuevas variedades con características agronómicas deseadas.

Pero, el cultivo de la caña de azúcar como cualquier cultivo está expuesto al ataque de diversos agentes patógenos, que desencadenan enfermedades de importancia económica dentro de las cuales se tienen las causadas por bacterias como: La enfermedad del raquitismo de la soca (RSD) agente causal es *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, escaldadura de la hoja (LSD) causado por *Xanthomonas albilineans* y así mismo, enfermedades causadas por virus (SCYLV), el virus de la hoja amarilla cuyo agente causal es *Sugarcane yellow leaf virus*, virus baciliforme cuyo agente causal es *Sugarcane baciloformis virus* (SCBV). Además, enfermedades causadas por hongos fitoparásitos como: Roya naranja (*Puccinia kuehnii*) y la Roya café (*Puccinia melanocephala*). Debido a esta problemática se han realizado investigaciones desarrollando técnicas biotecnológicas que permiten ayudar al sector agrícola a mejorar la calidad y evitar la propagación de enfermedades.

Cultivo *in vitro* es una técnica para obtención de plantas libres de patógenos, propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma, donde el material vegetal se mantiene en condiciones de laboratorio en recipientes herméticos y estériles (Villamizar, 2005) y en caña de azúcar se ha utilizado desde hace más de 50 años (Nickell, 1964), también es utilizada para la introducción de nuevos cultivares y limpieza de nuevas plantaciones de semilla original en apoyo al mejoramiento genético. En la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* utilizados se producen brotes individuales o grupos de brotes de material vegetal, los cuales requieren de una fase adicional de multiplicación y crecimiento de más plántulas y la formación de raíces de estas antes de salir a las condiciones naturales (Cheema y Hussain, 2004).

Para permitir la multiplicación, crecimiento y enraizamiento del material vegetal *in vitro* en cada recipiente hermético, se debe suministrar condiciones óptimas de luz y temperatura, así como un sustrato de alimento (medio de cultivo) que consiste en una mezcla de carbohidratos (sacarosa), fitohormonas y vitaminas, este debe tener los nutrientes esenciales para la planta, sustancias minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, agua y otros. Las composiciones químicas de los medios de cultivo resultan esenciales para las plantas porque forman parte de los requerimientos para el crecimiento, de 47 productos y suministran energía para la síntesis de metabolitos y el mantenimiento celular. Estos medios de cultivo pueden ser sustratos semisólidos o líquidos para la planta, y deben ser preparados bajo condiciones asépticas para evitar contaminación en el material vegetal. (Roca et al 1991).

La multiplicación del material vegetal se realiza mediante el sistema convencional o sistema de inmersión temporal SIT. En el sistema convencional se mantienen en contacto constante y estático con el medio (semisólido o líquido), mientras que el SIT creado en el año 1997 en el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD) de Francia por Teisson et al. (1996), ventajas del sistema: contacto intermitente del medio de cultivo líquido con el explante en un tiempo corto y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, evita la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos (Basail et al 2019), aumenta la producción, facilita la manipulación directa para su trasplante al campo, reducción de costos por vitroplantas. Basail, M. (2005)

Cenicaña está utilizando este sistema desde el 2017 en caña de azúcar para la multiplicación de semilleros sanos de variedades CC. Al implementar el SIT se encontró

que la variedad CC 05-430 presentaba pocas raíces, dificultando la obtención del material vegetal óptimo para aclimatación.

Por tal motivo, el presente trabajo evaluó bajo el (SIT) la cantidad de plantas por recipiente (biorreactor) y los diferentes medios de enraizamiento que permiten mejorar la cantidad o desarrollo de raíces en la variedad CC 05-430, la cual es considerada promisoría en Colombia.

Problema

La multiplicación masiva de caña de azúcar por el SIT en cultivo *in vitro*, se usa para la producción de semilleros con el fin de obtener semilla sana. Sin embargo, algunas variedades de caña de azúcar son difíciles de multiplicar por este medio como es el caso de la variedad promisorio CC 05-430 que en la actualidad está adquiriendo gran importancia en nuestra región. El problema se está presentando en la etapa de enraizamiento con el SIT y se manifiesta en la siembra de invernadero en donde se realiza el proceso de aclimatación. Si las plantas no cuentan con un buen enraizamiento, estas mueren en estas condiciones aumentando el tiempo, la mano de obra y los costos de producción.

¿Existe diferencias en la cantidad, peso y longitud de las raíces en las plantas del cultivar de caña CC 05-430, según diferentes medios de cultivo en la etapa de enraizamiento *in vitro* bajo el (SIT)?

¿La densidad de siembra por recipiente (plantas/biorreactor) o los diferentes medios de cultivo en la etapa de enraizamiento *in vitro* bajo el (SIT), generan diferencias en la longitud del tallo y las plantas del cultivar de caña CC 05-430?

Justificación

Uno de los desafíos del sector azucarero es el desarrollo de tecnologías para mejorar la productividad de los cultivos (Reyes, Orozco & De la Cruz, 2015). El cultivo de caña de azúcar es afectado por diferentes microorganismos sistémicos, causando enfermedades de importancia económica para el sector azucarero; para la propagación de semilla, se ha optado en muchos lugares por producir plantas sanas por cultivo *in vitro* usando el SIT con el fin de disminuir la afectación de estos patógenos en lotes semilleros. Sin embargo, en algunas variedades de caña de azúcar este sistema ha presentado dificultades en la fase de enraizamiento, como es el caso de la variedad CC 05-430 en la cual se hace importante identificar si la densidad de plantas por recipiente o los medios de cultivos establecidos para la inducción de raíces requieren de cambios o aumentos en las concentraciones en sus componentes. Por lo anterior, en este trabajo realizado en el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia, CENICAÑA, se evaluaron tres medios de cultivos que sirvieron para incluir al protocolo de multiplicación por el SIT en la fase de enraizamiento de la variedad mencionada anteriormente, disminuyendo el tiempo de enraizamiento y la eficiencia en la producción de plantas libres de patógenos, que a largo plazo se espera ayude a mantener y mejorar la producción de esta especie agrícola para mantener la entrega continua a los ingenios y proveedores en el valle del río Cauca.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar diferentes medios de cultivos para el enraizamiento de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) de la variedad CC 05-430 en condiciones *in vitro* en el sistema de inmersión temporal.

Objetivos específicos

- Comparar densidad de siembra con el medio de cultivo de enraizamiento Cenicaña en plantas de caña de azúcar-variedad CC 05-430.
- Estimar el efecto de tres medios de cultivo sobre el desarrollo de raíces en plantas de caña de azúcar- CC 05-430 a partir de las variables de respuestas: densidad poblacional, longitud y materia seca.

Marco teórico

Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

La caña de azúcar es originaria de Nueva Guinea, de allí emigró a diferentes lugares del norte de África, sur de Europa y Asia, luego fue introducida al continente americano por Cristóbal Colón y se extendió hacia Brasil en donde surgió una de las primeras industrias azucareras, y hacia Perú en donde se convirtió en la base principal de riqueza de la colonia durante más de doscientos años. En el año 1533 Pedro de Heredia ingresó la caña de azúcar por el caribe cuando fundó Cartagena y en 1541 llegó al Valle del Cauca con Sebastián de Belalcázar. (Victoria, J I y Calderón, H Cenicafña).

Taxonomía

La caña de azúcar presenta la siguiente clasificación botánica (Ecured, 2017):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Saccharum*

Especie: *Spontaneum y robustum (silvestre), edule, barberi, sinense y officinarum (Doméstica)*

La caña de azúcar que se siembra actualmente en Colombia corresponde al género *S. officinarum* y provienen de hibridaciones introducidas de otros países como: JAVA (POJ), Barbados (B), Hawai (H), Puerto Rico (PR), India (CO, coimbatore), Estados Unidos (CP, LP), Venezuela (V), Brasil (SP, RB) y República Dominicana (RD) (Osorio, 2007). Las variedades Cenicaña Colombia (CC) fueron creadas con el fin de generar resistencia a plagas, enfermedades y seleccionadas para diferentes zonas agroecológicas, la cual fue desarrollada para el ambiente semi-seco. Un caso de éxito es la variedad CC 05-430 siendo la tercera variedad más sembrada con 18,118.32 hectáreas que corresponde al 7.49 % del área cultivada en Colombia (informe anual 2020), destacada por su alta productividad, rápida germinación, cierre rápido que limita el desarrollo de arvenses, alto macollamiento y mayor población, su porte erecto facilita la cosecha y es resistente a plagas (salivazo y *Diatraea spp.*) y enfermedades (Carbón, Mosaico, Roya naranja y Roya café) (Cenicaña, 2019). Gracias a sus buenas características y alto rendimiento se requiere de la multiplicación masiva para la siembra de semilleros sanos con el fin de para garantizar la cantidad y la calidad de la semilla.

Requerimientos edafoclimáticos

La caña de azúcar se desarrolla Ambiente físico

- Temperatura

- Luz y fotoperiodo

- Humedad

En zonas tropicales y sub tropicales que cuenten con condiciones ambientales como: temperaturas medias entre 24 y 28°C, precipitaciones entre 980 a 1800, humedad relativa de 80%; también es importante que los suelos sean francos-areno-arcilloso, con profundidad de 80 a 90 cm lo cual ayudará a tener un buen drenaje, también es importante que posean buen contenido de materia orgánica, alta capacidad para almacenar agua, un pH entre 5,5 a 8 y unas buenas condiciones químicas como la capacidad de intercambio catiónico. Estas características ayudarán al buen desarrollo del cultivo en cada una de sus etapas (germinación, crecimiento vegetativo, maduración y cosecha (Cassalett, et al., 1995).

Morfología

La caña de azúcar cuenta con partes importantes para su desarrollo: raíz, tallo, hojas y flor.

Raíz

El sistema radicular permite el anclaje al suelo de la planta y la absorción de nutrientes hacia el tallo que se distribuyen por las hojas y la flor. Se originan a partir de la banda de primordios radical, localizada en el anillo de crecimiento del trozo original (estaca) que se planta o siembra. Son delgadas, muy ramificadas y su período de vida llega hasta el momento en que aparecen las raíces en los nuevos brotes o “chulquines”, Brotan de los anillos de crecimiento radical de los nuevos brotes. La cantidad, la

longitud y la edad de las raíces permanentes dependen de las variedades, sin embargo, existen factores ambientales como el tipo de suelo que afectan su desarrollo (Cassalett et al 1995).

En la caña de azúcar esta distribución puede ser de los tipos: absorbentes o superficiales, de anclaje o sostén y profundas. Las raíces superficiales predominan en los primeros 60 cm de profundidad y su distribución horizontal en el suelo alcanza hasta 2 m (Cassalett et al 1995).

Las raíces se clasifican en primarias, adventicias y primordiales el crecimiento de las raíces lo determinan factores como: resistencia mecánica, disponibilidad de agua, oxígeno y energía.

En caña de azúcar obtenida por multiplicación *in vitro* cuando se pasa a la inducción del enraizamiento en las plantas provenientes de la micro propagación es más difícil a causa de las altas concentraciones de citoquininas (en especial, la 6-bencilaminopurina) que se agregan a los medios de cultivos para provocar el ahijamiento, antes de pasar las plantas a un medio de enraizamiento (Roca, 1991).

La cantidad y longitud de raíces dependen de las variedades y los medios de cultivo, en los reportes encontrados la cantidad máximo es de 20 raíces y la longitud de 10 cm por plantas, Rangel et al encontrón que la altura de planta, el número de raíces por planta y la longitud de las mismas son afectados por la concentración de sales en el medio de cultivo en las tres variedades que evaluaron ($P \leq 0.05$). De igual forma consistente, las sales completas del medio de cultivo MS favorecieron el alargamiento de las plantas, pero redujeron la formación de raíces y su longitud en diferentes

variedades. Con el medio de cultivo a la mitad de la concentración de sales minerales el sistema radicular fue mayor y más compacto (Rangel et al, 2016).

En la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* utilizados en esta especie se producen brotes individuales o grupos de brotes, los cuales requieren de una fase adicional para su crecimiento y la formación de raíces antes de salir a las condiciones naturales (Cheema y Hussain, 2004; Ali et al., 2008; Behera y Sahoo, 2009; Yadav et al., 2014; Medeiros et al., 2015).

La formación de raíces *in vitro* es una práctica generalizada y en ocasiones es el único método para enraizar una planta, en inmersión temporal se producen brotes individuales o grupos de brotes que requieren de su enraizamiento *in vitro* antes de ser transferidos a condiciones naturales (Borrero et al 2017).

Tallo

Los tallos son puente para el transporte de nutrientes y agua, un tallo puede llegar a medir 2 a 3 m por año y puede llegar a formar hasta 23 macollos y tienen forma erecta. Cada variedad tiene diferentes características de acuerdo con las condiciones ambientales y manejo agronómico, en el tallo se encuentra la sacarosa y rentabilidad del cultivo.

Existen variedades en las cuales el desarrollo vegetativo no es uniforme y presentan una alta frecuencia de tallos con edades muy diferentes (Cassalett, et al., 1995).

Cuando se realiza la multiplicación de plantas por cultivo *in vitro* para la etapa de multiplicación se determinó que hay mayor número de brotes en explantes provenientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). Además, los tallos crecen de acuerdo a las condiciones que se le dé al cultivo la altura de un tallo por cultivo *in vitro* puede tener un máximo de 3,65 cm y por lo que se hace necesario determinar el tiempo y la frecuencia de inmersión según la fase de cultivo para satisfacer los requerimientos del material vegetal (Escalona, 2006).

De Feria et al. (1998), recomendaron para los recipientes de los SIT una densidad de 40 brotes de caña de azúcar, la cual les permitió obtener mayor coeficiente de multiplicación (10,92) y un peso promedio de 5,74 mg por brote.

Determinación de la densidad de explantes en el cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011" (AAB) en el SIT cuando sembraron 80 explantes se aumentó el coeficiente de multiplicación (Pérez et al, 2011).

Hojas

Las hojas son largas, delgadas y planas en promedio pueden medir entre 0.90 a 1.5 m de largo y varían de 1 a 10 cm de ancho, según la variedad. Se encarga de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis (Cassalett et al 1995).

Meristemo apical

Se encuentra en la parte superior de la planta, esta célula meristemática se encuentra cubierta por primordios, al ser extraída se regenera y da origen a una planta con las mismas características genética de la planta madre, son utilizados para la

producción de plantas libres de patógenos por la falta de carencia de vías de conducción para virus y viroides en estos tejidos permite lograr la sanidad de las plántulas.

Métodos de propagación

La propagación del cultivo de caña de azúcar se puede realizar de tres formas:

Sistema convencional

En este sistema se usan yemas que son sometidas a proceso de hidrotérmico para eliminar de plantas libres de patógenos. Estas yemas se siembran bajo invernadero en bandejas plásticas usando un substrato compuesto por suelo, cachaza y arena en partes iguales; a los 3 meses después de sembradas las yemas, las plántulas generadas se puede hacer el trasplantar a campo (Victoria y Calderón, 1995).

Multiplicación por esquejes

En este sistema se utilizan trozos del tallo de una edad entre 6 a 8 meses, cada trozo es de aproximadamente 30 cm de largo y que abarquen de tres a cuatro yemas, las cuales se siembran directamente en el campo. Se recomienda hacer diagnóstico de enfermedades para establecer si debe o no emplear material de determinado semillero (Martínez, 2012).

Cultivo *in vitro* (meristemos)

Es una técnica que permite separar la célula meristemática del explante en condiciones asépticas, controladas y se desarrolla en un medio de cultivo con

características físico-químicas definidas, este proceso está compuesto por diferentes fases las cuales ayudarán al desarrollo del cultivo en condiciones del laboratorio (Victoria y Calderón, 1995).

Fases del cultivo *in vitro*

Selección de la semilla: las plantas de las cuales se extrajeron las yemas tenían una edad entre siete y ocho meses, se les realizó un tratamiento preventivo para evitar propagación de enfermedades en el cultivo, sembrar las yemas y tenerlas bajo invernadero durante seis semanas brindándole condiciones sanitarias óptimas y riego adecuado para permitir un crecimiento vigoroso con el fin de obtener explantes con un grado de desarrollo adecuado (Victoria y Caldero, 1995).

Establecimiento del meristemo: Los explantes (tallos) obtenidos en la selección de semillas son llevados al laboratorio donde se realiza el proceso de desinfección para eliminar contaminantes externos como hongos y bacterias que se pueden encontrar en los tallos. Después se llevan a cabina de flujo laminar donde se realiza la extracción de los meristemas y se ponen en un medio de cultivo estéril que contiene fitohormonas para la elongación de las células meristemáticas durante dos meses, dando inicio al ciclo del cultivo (Moreno y Victoria, 1991).

Multiplicación de brotes: Los meritemos que presentaron un buen desarrollo se pasan a la etapa de multiplicación donde dan origen a los nuevos brotes con la ayuda de un medio de cultivo que contiene fitohormonas como las citoquininas que ayuda a la división celular, en este proceso se hacen las divisiones y resiembras de los brotes

nuevos a biorreactores hasta obtener el número de plantas requeridas (Roca et al 1991).

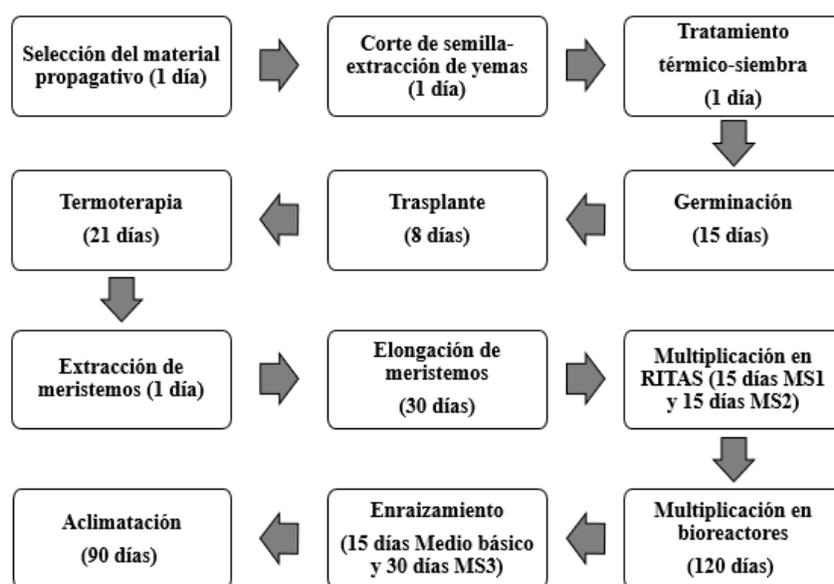
Enraizamiento de las plantas: Es la última etapa de las plantas antes de salir a condiciones *ex in vitro*. En los métodos de propagación *in vitro* utilizados en caña de azúcar se producen brotes individuales o grupos de brotes, los cuales requieren de una fase adicional para su crecimiento y la formación de raíces (Heema y Hussain, 2004). Pero en algunas variedades se presenta dificultad en inducir un sistema radical que sea completamente efectivo cuando la planta se transfiere al suelo (George, 1993). Las raíces que se forman son las raíces adventicias, son monocotiledóneas se desarrollan en los nudos inferiores del tallo que al penetrar en la tierra realizan la función de las raíces normales. Para obtener raíces por *in vitro* se utilizan fitohormonas como las auxinas que ayudan a estimular la formación de raíces (Olmos, 20159). La raíz permite sostener la planta y la absorción de los nutrientes en la aclimatación *ex in vitro*.

El enraizamiento *in vitro* se conoce como la etapa de transferencia de las partes aéreas (brotes) a los medios de cultivo de enraizamiento con auxina para la formación de raíces adventicias. La formación de raíces en un brote *in vitro* es un proceso complejo que consta de al menos dos etapas: la formación de primordios de raíces a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de raíces. Ambas etapas requieren auxinas, aunque las necesidades de cada una son diferentes y depende de la especie.

Después de saber la importancia de las raíces en las plantas, el enraizamiento *in vitro* se obtiene mediante la inducción de auxinas, en algunas especies se obtienen de manera natural, al ser inducidas se debe tener en cuenta las concentraciones de las

hormonas. Se ha reportado que las concentraciones más altas de NAA (ácido 1-naftalenacético) reducen la inducción de la raíz ya que promueve la biosíntesis de etileno, el cual tiene un efecto inhibitor en el enraizamiento de la caña de azúcar (Tesfa et al 2016). Por su parte Gill et al. (2005) sostienen que 5 mg L⁻¹ de NAA mejoran la regeneración de vástagos en las variedades CoJ64, CoJ83 y CoJ86 de caña de azúcar y que en ausencia de auxinas no hay regeneración de tejidos en estas variedades.

Figura 1. *Proceso de producción de plantas por cultivo in vitro.*



Fuente: Autoría propia

Sistemas de propagación de la caña de azúcar por cultivo *in vitro*

Estos sistemas de multiplicación permiten obtener las plantas requeridas para la siembra o conservación de un cultivo, mediante el sistema *in vitro*, los sistemas que más se utilizan son:

Sistema convencional: se utiliza un recipiente de vidrio que contiene medio de cultivo estático previamente esterilizado, donde la planta hace su desarrollo vegetativo.

SIT: se utiliza para la multiplicación de plantas de manera masiva, para el aprovechamiento de los espacios, disminución de tiempo, disminuir costos en la producción de plantas, este sistema se compone de dos contenedores que le permiten la introducción de aire por una válvula, que permite el medio de cultivo pasar de un contenedor a otro. La técnica de propagación de tejidos vegetales llamada (SIT), este sistema es una herramienta que abre la posibilidad de semiautomatizar los procesos de micropropagación de cultivo *in vitro* a partir del uso de biorreactores y bajo unas condiciones asépticas y controladas, obteniendo así obtener mejores resultados (Bello et al.2015). La multiplicación mediante ápices cultivados *in vitro*, ofrece una valiosa alternativa para la reproducción acelerada de semillas agámicas, permitiendo reducir ciclos de multiplicación en los programas de semilla y garantiza la obtención de plantas libres de enfermedades (Pérez et al., 1998).

Medios de cultivos

La composición de los medios de cultivo que se emplean en el cultivo *in vitro* de plantas varía según el tipo de tejido que se quiere propagar (protoplastos, callo, meristemos), las etapas de desarrollo del material (multiplicación, elongación o enraizamiento), el tipo de sistema (convencional o inmersión temporal), y la especie vegetal que se quiera multiplicar. A tal punto que se puede encontrar diversa literatura de los medios de cultivo a emplear y en algunos no se tiene información porque la

especie vegetal no se ha trabajado o porque existe un interés comercial que limita o evita compartir esta información.

Teniendo en cuenta que cada especie vegetal tiene sus requerimientos particulares para maximizar cada una de las etapas de desarrollo, se debe procurar por establecer los componentes y cantidades en particular que permiten su propagación adecuada. En términos generales cada medio debe estar conformado por: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares y en algunos casos para medios sólidos agentes gelificantes (Murashige y skoog1962).

Macronutrientes: Los seis elementos mayores: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), conforman los macronutrientes requeridos por las células vegetales para alcanzar un crecimiento adecuado estructuralmente.

Micronutrientes: Se consideran importantes para el desarrollo de las plantas y se utilizan en bajas concentraciones, para el crecimiento de los vegetales. De los que más se utilizan son: hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B) y molibdeno (Mo) (Murashige. et al.1962).

Vitaminas: Las plantas superiores sintetizan las vitaminas esenciales que contribuyen a su crecimiento y desarrollo, pues estas se insertan en las células vegetales para contribuir a su normal progreso (Perea 2009).

Carbohidratos: Son las fuentes de carbono más importantes en los cultivos *in vitro*; por consiguiente, las condiciones de crecimiento deben ser estimuladas con el

empleo de los carbohidratos para promover el proceso de la fotosíntesis. La glucosa provee energía de manera más rápida a las células vegetales.

Reguladores de crecimiento: Se conocen como fitohormonas vegetales actúan a muy bajas concentraciones, permiten el desarrollo y metabolismo del vegetal para la obtención de plantas por cultivo de meristemas (Kartha et al., 1981), de acuerdo a la etapa que se encuentre el cultivo es importante agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento para el desarrollo del cultivo, las fitohormonas más usadas son las auxinas, citoquininas y giberelinas (Roca et al 1991).

Antioxidantes: Se ha reportado que el carbón activado y ácido cítrico ayudan a disminuir el efecto de oxidación de fenoles, se puede agregar estos componentes al medio de cultivo (Roca et al 1991).

Clasificación de los medios de cultivo:

- Medio 1. Permite a la célula meristemática elongar en la primera etapa.
- Medio 2: Ayuda a la división celular para la obtención de nuevas plantas en la multiplicación.
- Medio 3: Su función es estimular la aparición de raíces en las plantas para ser luego ser llevadas a la etapa *ex in vitro* para su aclimatación.

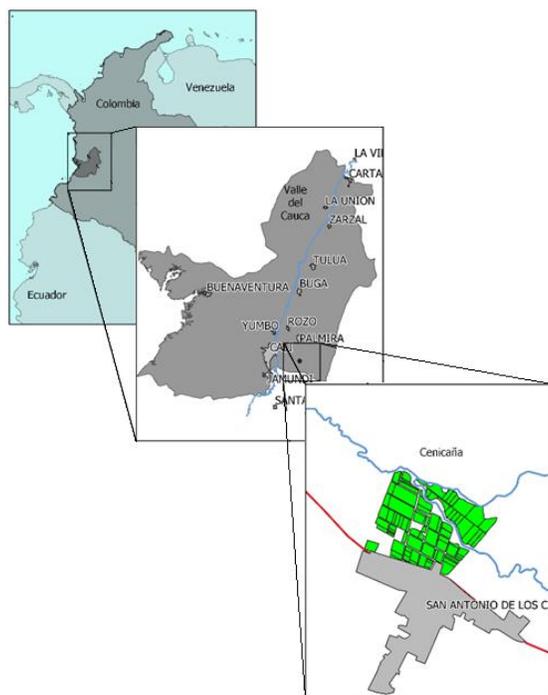
En la etapa de enraizamiento se realizó el ensayo por el SIT en biorreactores, debido a que el sistema ayuda a la multiplicación masiva, reducir en gran medida el tiempo, la mano de obra y los costos asociados a la micropropagación de plantas por cultivo *in vitro* (Da Silva et al., 2020).

Metodología

Localización

Este trabajo se realizó en CENICAÑA Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia en el laboratorio de cultivo *in vitro* en el área de fitopatología, en la estación experimental ubicada en el corregimiento de San Antonio de los caballeros (EESA), perteneciente al municipio de Florida (Valle del Cauca), a 3° 21' de latitud Norte, 76° 18' de latitud Oeste y 1024 metros sobre el nivel del mar. En la figura 2 se muestra la ubicación de Cenicaña.

Figura 2. Mapa de ubicación de Cenicaña.



Fuente: Área geomática de Cenicaña.

Obtención del material vegetal

En la etapa cero se seleccionaron 15 plantas de la variedad CC 05-430 que tenían 8 meses de edad; se extrajeron las yemas con ayuda de una cizalla y se les realizó el tratamiento térmico un pre tratamiento por 10 minutos y al otro día otro tratamiento durante una hora a 51°C, para eliminar patógenos de origen bacteriano (Cenicaña 1996). Luego se sembró la semilla en sustrato de carbonilla y se dejaron por 20 días, culminado este tiempo las plantas germinadas se trasplantaron individualmente en vasos de icopor en sustrato compuesto por suelo y arena en una proporción 3:1 por 10 días. Posteriormente se colocaron las plantas a termoterapia por 21 días siguiendo el protocolo de Cenicaña. Finalizado el tiempo en termoterapia, se cortaron los tallos de las plantas y se llevaron al laboratorio de cultivo *in vitro*.

Fase de laboratorio

La figura 3 representa de forma resumida el proceso de laboratorio posterior a la obtención del material vegetal.

Figura 3. Proceso de enrizamiento por el SIT en plantas de caña de caña de azúcar.



Fuente: Autoría propia (2021).

Nota: a. brotes seleccionados, b. siembra en biorreactores, c. desarrollo de las plantas, d. plantas después del enraizamiento, e. evaluación de las plantas.

Los explantes extraídos en la fase anterior fueron llevados al laboratorio al proceso de esterilización el cual se realizó de la siguiente manera: se lavaron con agua potable, luego se sumergieron en TEGO 51 por cinco minutos.

La esterilización de los explantes se realizó a partir de lavado con desinfectante TEGO con agua, para quitar el TEGO 51 se sumergieron nuevamente en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 20 minutos y por último se lavaron con agua esterilizada. Después de tener los explantes en condiciones asépticas se procedió a extraer los meristemas en la cámara de flujo laminar con ayuda de un estereoscopio, pinzas y bisturí previamente esterilizados, luego se sembraron en medio previamente estéril, utilizando el sistema convencional en frascos viales los cuales contenían 5 ml de medio líquido nutritivo MS1 (tabla 1); se sellaron los frascos con vinipel (papel plástico) se rotularon y se dejaron 30 días, después los meristemas vivos se pasaron a frascos compotas que contenían 25 ml del medio MS1 y se dejaron otros 30 días para obtener la elongación de los meristemas elongados.

Después de tener meristemas elongados se utilizó el SIT- RITA® (recipiente de inmersión temporal automatizada) donde el compartimiento superior contiene explantes y el inferior contiene el medio de cultivo líquido, están unidos entre sí, al introducir aire por los filtros la presión entra hasta la parte inferior y empuja el medio al compartimiento superior donde las plantas se sumergen temporalmente, al bajar la presión el medio

regresa al compartimiento inferior y la frecuencia y período de tiempo pueden regularse, (figura 4).

Figura 4. Sistema de Inmersión temporal - Rita con meristemos elongación



Fuente: Autoría propia (2021)

Utilizando cinco meristemos con 200 ml medio MS1 (tabla 1) que está programado con ocho inmersiones diarias cada tres horas y tiene un periodo de luz de 16/8 horas luz, se dejaron los meristemos por 15 días y después se les cambió el medio por MS2 200 ml y se dejaron 15 días más, este proceso se hizo antes de pasar las plantas a los biorreactores (figura 1).

Los meristemos provenientes de las RITAS® se sembraron en biorreactores (recipiente vidrio de 4 L y otro de 750 ml para el medio de cultivo con tapones de caucho y dos agujeros para conectar las mangueras entre si con dos filtros) con 300 ml de medio liquido MS2 (tabla 1) este proceso se realizó con cambio de medio cada 15 días y división cada 30 días hasta la cuarta división donde se obtuvieron las plantas

para la etapa de enraizamiento. El SIT fue programado a ocho inmersiones diarias con 10 minutos, 16 horas luz, ocho horas de oscuridad y humedad relativa de 60%.

Las condiciones de preparación de los medios de cultivo se establecieron de acuerdo a Roca (1991), total asepsia en todo el proceso desde los pesajes de los componentes, se ajustó el pH correspondiente a cada medio y posteriormente esterilizados a 121°C por 21 minutos. Después de estar a temperatura ambiente se adicionaron los reguladores de crecimiento.

Tabla 1. *Medios de cultivos para la elongación de los meristemos y multiplicación de las plantas.*

Función	Componentes	Medio (MS1)	Medio (MS2)
		elongación	multiplicación
Fuente carbohidratos	Sacarosa (g)	25	25
Antioxidantes	Ácido cítrico (100mg/L)	100	100
	Carbón activado (mg)	10	10
Reguladores	Ácido Indol Butírico (IBA)0.05mg/mL-10mg/200ml	1	

	Ácido giberelico (Ga3) 10mg/100mL	1	
	6-Bencilaminopurina, benciladenina (BAP) mg		1
	Kinetina 10 mg/100mL)		1
Vitaminas	Sales MS vitaminas (g)	4,43	4,43
	Myo-Inositol (mg)	100	100
pH	pH (5.75-5.80)		

Nota. Los reguladores se prepararon en soluciones stock y se alícuota con pipeta a cada medio por litro.

Ensayo para evaluar dos densidades de siembra en la variedad CC 05-430 de caña de azúcar.

Para evaluar el efecto de densidades de siembra sobre el enraizamiento de las plántulas de CC 05-430, se empleó el material vegetal de la división cuarta etapa de multiplicación. Se seleccionaron las plantas que tuvieran igual tamaño y se distribuyeron aleatoriamente en los tratamientos a evaluar que consistían en 50 y 90 plantas por biorreactor (recipiente de vidrio de 4 L).

Las plantas se dejaron por un tiempo 45 días y se cambió el medio líquido Cenicaña cada 15 días después se evaluaron las plantas. Las condiciones del fotoperiodo fueron 14 horas luz (proporcionado por lámparas de luz fluorescente x longitud de onda o intensidad de la luz) y 10 horas oscuridad a una temperatura promedio de 23°C y humedad relativa de 60%.

Para evaluar las densidades se tomó de cada biorreactor 20 plantas al azar donde se registró el número de raíces, longitud de raíces, longitud del tallo y longitud de la planta luego de 30 días en el medio de enraizamiento de Cenicaña.

Una vez se obtuvo la densidad se establecieron los tratamientos del estudio correspondientes a los medios de cultivo: medio 1 (M1), medio 2 (M2) y medio 3 (M3), los cuales fueron comparados con el medio de cultivo Cenicaña Testigo (Tabla 2).

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para el enraizamiento en la variedad CC 05-430 por cultivo *in vitro* en el SIT.

Función	Componentes	Cenicaña Testigo	M1	M2	M3
Fuente carbohidratos	Sacarosa (g)	25	25	25	50
	Ácido cítrico (100mg/L)	100	100	100	100
Antioxidantes	Carbón activado (mg) L	50	50	50	50

	Ácido 1-naftalenacénico				
	(NAA)5	5	3	3	3
Reguladores	mg/mL.500mg/100mL				
	Kinetina 10 mg/100mL)	1	1	1	
	Sales MS vitaminas (g) L	4,43	4,43	2.215	2.215
Vitaminas					
	Myo-Inositol (mg) L	100	100	100	100
	pH (5.75-5.80)				

Nota. Los reguladores se prepararon soluciones stock y alícuota con una pipeta a cada litro.

Evaluación de medios de cultivos.

Teniendo en cuenta los resultados de densidad de plantas por biorreactor se procedió a evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo sobre el enraizamiento de las plantas, para lo cual se seleccionaron 1080 plántulas de igual tamaño provenientes de cuarta división y se distribuyeron aleatoriamente en biorreactores para un total de 90 plantas por biorreactor y un total de doce biorreactores, los cuales se dejaron por un espacio de 45 días, 15 días en medio sin reguladores de crecimiento como un pre-acondicionamiento y descanso y 30 días en los medios de enraizamiento renovando los medios cada 15.

Las variables evaluadas fueron peso fresco y seco de las raíces el peso de la planta, para esto se utilizó una balanza analítica Mettler Toledo con una precisión de 0.0001. Para obtener el peso seco de las raíces se dejaron secar las muestras a 65°C por diez horas en un horno Thermo Scientific. Las variables longitud del tallo, longitud de la planta y longitud de las raíces se midieron con una regla.

Análisis estadístico

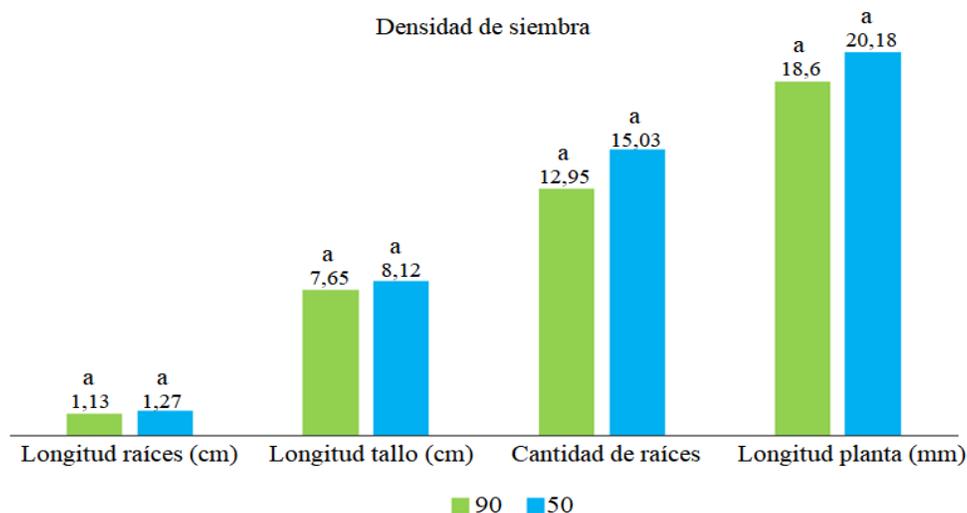
Para el análisis de densidad de 50-90 de plantas y para el análisis de los medios de cultivo se empleó un diseño completamente al azar. Los datos se corrieron en programa estadístico SAS. 9.4 módulo start 15.1 y las gráficas con SAS graph diseño.

Resultados y Discusión

Densidad de plantas por biorreactor de caña de azúcar en la variedad CC 05-430

La variedad CC 05-430 en biorreactores después de 30 días de enraizamiento muestra que una planta puede tener en promedio entre 13 a 15 raíces por planta y las raíces de 1 cm aproximadamente, teniendo el tallo de la planta una longitud entre 7 a 8 cm de longitud para una longitud total de 18 a 20 cm cada planta. Entre las densidades de siembra de 50 y 90 plantas por biorreactor con el medio Cenicaña, no se presentaron diferencias significativas con ninguna de estas variables (figura 4); sin embargo, tener 90 plantas por biorreactor permitiría disminuir los costos de producción de los medios, incrementar el número de plantas teniendo un mismo espacio, lo cual mejoraría la relación costo beneficio.

Figura 5. Cantidad de raíces, longitud de raíces, longitud de la planta y longitud del tallo de la variedad CC 05-430. Empleando 50 y 90 plantas por biorreactor bajo el SIT durante 30 días empleando el medio de enraizamiento Cenicaña.



Letras no comunes indican diferencias significativas en la densidad de s variables evaluadas para la densidad de según prueba Tukey ($P < 0.05$) no se encontraron diferencias.

Estudiar la densidad de explantes por frasco permite según Orellana (1998) establecer mejores proporciones del medio de cultivo, mano de obra y reactivos en general, siendo este un parámetro de vital importancia; ya que se optimiza el uso de los recipientes generando ganancias en el proceso. En términos de densidad, Basail et al (2007) encontró que aumentar la densidad de plantas de yuca en SIT se refleja en un aumento en el coeficiente de multiplicación y peso total de la planta.

Medios de enraizamiento para caña de azúcar en la variedad CC 05-430.

Se encontraron diferencias significativas en los medios de cultivos evaluados en la variedad CC 05-430 al modificar algunos componentes en los tratamientos, tal como se registra en la tabla 2.

Número de raíces: Para los medios de enraizamiento se presentaron diferencias ($P < 0.001$), siendo el medio 2 y el medio 3 los mejores en comparación al medio 1 y medio Cenicaña (tabla 3).

Tabla 3. *Efecto de los medios de cultivo en cada una de las variables evaluadas en la variedad CC 05-430 en el sistema de inmersión en el enraizamiento in vitro de las plantas.*

Medios enraizamiento	Número raíces	Longitud raíces	Peso húmedo raíz	Peso seco raíz	Longitud tallos	Longitud planta	Peso total de la planta
Cenicaña (T)	12,62 ± 1,94	± 0,15	± 0,01	± 5,88	± 15,27	± 0,61	±
	1,14 b	0,19 b	0,04 c	0,002 b	0,24 ab	0,79 b	0,07 b
M1	11,13 ± 2,55	± 0,12	± 0,01	± 6,61	± 19,79	± 0,51	±
	1,14 b	0,19 b	0,04 c	0,002 c	0,24 ab	0,79 a	0,07 c
M2	24,55 ± 3,95	± 0,40	± 0,02	± 5,67	± 20,25	± 0,75	±
	1,14 a	0,19 a	0,04 b	0,002 b	0,24 b	0,79 a	0,07 b
M3	25,58 ± 3,60	± 0,67	± 0,04	± 4,39	± 13,69	± 1,16	±
	1,14 a	0,19 a	0,04 a	0,002 a	0,24 c	0,79 b	0,07 a

Nota. La cantidad de cada componente por litro. Medio Cenicaña sacarosa 25g, NAA 5 mg, sales MS 4.43g, medio 1. Sacarosa 25g, NAA 3mg, medio 2. Sacarosa 25g, NAA 3mg, sales MS 2.215 y medio 3. Sacarosa 50g, NAA 3mg, sales MS 2.215g.

Longitud de las raíces: Se presentaron diferencias entre los medios de enraizamiento para esta variable ($P < 0.001$). Los medios M2 y M3, se diferenciaron del medio testigo en las dos variables. Peso húmedo de las raíces ($P < 0.001$). Peso seco de las raíces ($P < 0.001$), M3 fue mejor en comparación de los otros medios.

Longitud de los tallos: Para los medios de enraizamiento presentó las diferencias ($P < 0.001$), en el medio Cenicaña, M1 y M2 se obtuvo mejor desarrollo de los tallos en comparación con M3.

Longitud de la planta: Los medios de enraizamiento presentaron las diferencias ($P < 0.001$), donde M1 y M2 presentaron mayor longitud de las plantas y se diferenció de los otros medios.

Se observa que al reducir el NAA y las sales MS (medio 2) o reducir el NAA, reducir las sales, incrementar la sacarosa y retirar la kinetina (medio 3) se puede tener un incremento en la cantidad de raíces y longitud de raíces en las plantas de CC 05-430. Por otra parte, no basta con solo disminuir el NAA; ya que el medio 1, no se diferenció del medio Cenicaña en estas variables. Por otra parte, el medio 3 permite tener un mayor peso de las raíces y las plantas, por lo cual es el medio aconsejado para seguir multiplicando esta variedad.

Los componentes y la cantidad de cada ingrediente en los medios generan diferencias en los genotipos (Murashige, Skoog, 1962 y Tesfa, M., Admaassu., B. y Bante., K. (2016).

La sacarosa se adiciona al medio de cultivo de las plantas *in vitro* para permitir un rápido crecimiento heterotrófico ya que la producción de energía y carbohidratos por la fotosíntesis *in vitro* cuando la iluminación baja en los cuartos de cultivo *in vitro* dificulta el desarrollo adecuado en las plantas (Leifert et al., 1995).

La citocinina kinetina (KIN) se utiliza para estimular la división celular, el crecimiento y el desarrollo. (Pierik, 1990).

En el caso de la sacarosa para aumentar el enraizamiento se debe utilizar 30 g por litro de acuerdo a la necesidad de cada genotipo, de lo cual se pudo evidenciar en este estudio y en lo reportado por Tesfa, (2016) argumenta que es muy significativa en la longitud de la raíz y el número de raíces por brote, las raíces se desarrollan mejor en cuanto a cantidad y longitud y peso húmedo y seco. También al adicionar sales a la mitad MS con diferentes concentraciones de NAA no se registra ningún enraizamiento en los micro-brotes sin presencia de sacarosa, con esta investigación también se evidencia que al reducir las sales y dejar la misma cantidad de azúcar el peso de las raíces no aumentó.

De acuerdo a Roca, (1991) en caña de azúcar obtenida por multiplicación *in vitro* cuando se pasa a la inducción del enraizamiento en plantas provenientes de la micropropagación es más difícil a causa de las altas concentraciones de citoquininas (en especial, la 6-bencilaminopurina) que se agregan a los medios de cultivos para provocar el ahijamiento, antes de pasar las plantas a un medio de enraizamiento, por tal motivo se debe realizar un periodo de descanso de las plantas en medio sin citoquininas antes de anexar los medios de enraizamientos.

Teniendo en cuenta que las citoquininas son para división celular se deben eliminar en la etapa de enraizamiento, debido a que la planta está en función de producción de raíces.

El mismo autor ha encontrado que al adicionar sales a la mitad MS con diferentes concentraciones de NAA no se registra ningún enraizamiento en los microbrotes sin presencia de sacarosa, con esta investigación también evidencia que al reducir las sales y dejar la misma cantidad de azúcar el peso de las raíces no aumentó, por lo tanto, la sacarosa es indispensable en la producción de raíces y su calidad. El presente estudio en M2 a partir de la reducción del 40 % NAA y el 50 %? de las sales MS con relación al testigo, aumentó el enraizamiento y mantuvo un mejor desarrollo en las plantas, pero disminuyó el peso de las raíces.

Teniendo en cuenta que NAA hace parte de las auxinas es importante tener en cuenta que las etapas fisiológicas del enraizamiento también están correlacionadas con los cambios en las concentraciones de auxinas endógenas (Heloir et al. 1996). Al aplicar auxina exógena, la concentración de auxina endógena alcanza un pico coincidiendo con el inicio del proceso de enraizamiento (Gatineau et al.1997). Al respecto, Caboni et al. (1997) encontraron que una alta concentración de auxinas endógenas normalmente se asocia con una alta tasa de enraizamiento al comienzo del proceso. En este sentido es importante adicionar la afirmación de Da Silva et al., (2020) argumentan que la generación de raíces se obtiene dependiendo del genotipo y que la adición de la fitohormona NAA acelera el enraizamiento y mejora las plantas, es importante que la concentración de los inductores de raíces no se utilice en grandes cantidades y se realice de forma equilibrada.

Acosta et al., (2008), concluye que el enraizamiento *in vitro* se conoce como la etapa de transferencia de las partes aéreas (brotes) a los medios de cultivo de enraizamiento con auxina para la formación de raíces adventicias. La formación de

raíces en un brote *in vitro* es un proceso complejo que consta de al menos dos etapas: la formación de primordios de raíces a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de raíces. Ambas etapas requieren auxinas, aunque las necesidades de cada una son diferentes y depende de la especie.

Rangel et al, 2016, indica que con el medio de cultivo a la mitad de la concentración de sales MS, encontraron que el sistema radicular fue mayor y más compacto. De igual forma las sales completas del medio de cultivo MS favorecieron el alargamiento de las plantas, pero disminuyeron la cantidad de raíces, esto ocurre cuando se evaluó la longitud de las plantas (tabla 3).

Aunque la variedad CC 05-430 por cultivo *in vitro* mediante el SIT se ha caracterizado por presentar dificultad de enraizamiento, con los resultados obtenidos se podrá realizar la propagación de la variedad teniendo en cuenta la densidad de 90 plantas por biorreactor, ya que antes se utilizaba una densidad de 50, lo que permite aprovechar más el espacio y tener 90 % de plantas enraizadas.

En los componentes del medio cabe resaltar que en cuanto al costo, el valor del medio disminuiría teniendo en cuenta que las fitohormonas y las sales MS son costosas y hace que el sistema y el medio beneficien a cualquier productor en la producción de semilla de sana y de calidad.

Finalmente es importante tener en cuenta que, aunque se hacen muchos esfuerzos por obtener raíces *in vitro*, algunas variedades son vulnerables y no funcionan bien en condiciones in vivo (no tienen o tienen pocos pelos radiculares), por lo que mueren rápidamente y deben ser reemplazadas por nuevas raíces subterráneas.

Un mal desarrollo del sistema de raíces dificulta el crecimiento in vivo, especialmente cuando hay una alta transpiración. Es extremadamente importante que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible cuando se plantan en condiciones ex vitro (De Souza y Grasso 2012). También sugieren que el genotipo también tiene una importancia clave en el proceso de enraizamiento, es en caso de la variedad CC 05-430 que presentó dificultad en esta etapa.

Conclusiones

No se observó un efecto en la cantidad y longitud de raíces en la variedad CC 05-430 a diferentes densidades de siembra, sin embargo, se recomienda emplear 90 plantas/biorreactor para optimizar la producción y disminuir costos.

Las diferencias presentadas a los 45 días en el número y peso de raíces de las plantas evaluadas al disminuir las sales MS a la mitad, NAA al 60 %, duplicar la sacarosa y quitar la kinetina en etapa de enraizamiento, sugiere una importante incidencia de la proporción de estas sustancias en el desarrollo radicular de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), en la variedad CC 05-430 bajo el SIT.

Referencias

- Ali. A., Naz, S., Siddiqui, F.A., Iqbal, J., (2008) *An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation*. Pak J Bot 40(1): 139-149.
https://www.researchgate.net/publication/216321228_An_efficient_protocol_for_large_scale_production_of_sugarcane_through_micropropagation.
- Arredondo, C. A. (2019). *Diseño y automatización de un nuevo biorreactor para sistemas de inmersión temporal*. México. Universidad Autónoma del Estado de México.
<http://hdl.handle.net/20.500.11799/98805>.
- Asocaña. (2012). *El sector azucarero colombiano en la actualidad*. Cali, Colombia. Sector azucarero colombiano. <https://www.asocana.org/>
- Basail M, Medero V, Robaina A, Rubio A, Torres. Y, Santos A, Rayas A, Rodríguez D, Beovides Y, Gutiérrez Y. (2019). *Aplicación de VIUSID Agro® en la propagación in vitro del cultivar de banano 'Cavendish enano' en Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA®*. Evento de Catalisys 2019, Habana.
- Basail, M. (2005). *Multiplicación en Sistema de Inmersión Temporal del cultivar híbrido 'FHIA 21' (AAAB)*. Tesis para optar por el Grado Científico de Master en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara.
<http://dspace.uclv.edu.cu:8089/handle/123456789/2995>.

Basail, M., Medero, V., Martínez, M., Ventura J. de la C., López J., García, M., Cabrera M., Santos, A., Rayas, A., Pons, C., Bauta, M., Álvarez, M. y García, J. (2007). *Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la micropropagación de la yuca en Sistema de Inmersión Temporal*. Biotecnología vegetal Vol. 3, No. 2: 93 - 96.

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/227>

Behera KK, Sahoo S (2009) *Rapid in vitro micropropagation of sugarcane (Saccharum officinarum L. cv-Nayana) through callus culture*. Nature and Science 7(4): 1-10

http://www.scielo.org.mx/article_plus.php?pid=S0187-73802016000300225&tlng=es&lng=es

Béllo, J. y Iglesias A., L. (2015). *Desarrolla el INBIOTECA sistemas de biorreactores para la micropropagación de especies vegetales de importancia para el estado de Veracruz*. Agro Entorno, INBIOTECA, 7-8.

<https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/1049>

Betancourt, G. J. M. (2017). *Evaluación del cultivo in vitro de caña de azúcar (saccharum officinarum) var. ccsp 89-43 a partir de meristemos apicales mediante la técnica de organogénesis*. Bucaramanga, Colombia. Universidad de Santander.

<https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/4351/1/Evaluaci%C3%B3n%20del%20cultivo%20in%20vitro%20de%20ca%C3%B1a%20de%20az%C3%BAcar%20%28Saccharum%20officinarum%29%20VAR.%20CCSP%2089->

43%20a%20partir%20de%20meristemas%20apicales%20mediante%20la%20t%C3%A9cnica%20de%20organog%C3%A9nesis..pdf

Borrero, L. N., Ruíz, M. C., Morgado, M. E., Sánchez, P. M., Morera, N. V. y Laffitte, O. C. (2017). *Caracterización histológica del enraizamiento in vitro de brotes de caña de azúcar en medio de cultivo líquido*. Cuba. *Biotechnología vegetal*, 17(2).
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/548>

Cassalett, C. D., Torres, J. A y Echeverry, I. C. (1995) El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia.
https://www.cenicana.org/pdf_privado/documentos_no_seridados/libro_el_cultivo_cana/libro_p3-394.pdf.

Castañeda, C.O.G., Trello M. F.C., Téllez, L.I., Solano, P., Martínez, O. Y., González, A. Ma. T. y Guevara, V. M. (2009). Estado nutrimental y crecimiento de vitroplantas de caña de azúcar en respuesta a reguladores de crecimiento. *Terra Latinoamericana*, 27(3), 177-185.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792009000300002&lng=es&tlng=es.

Cenicaña (2019). *Informe anual 2019. (24a Ed.)*. Cali Valle del Cauca, Colombia: Servicio de corporación técnica y transferencia de tecnología.
https://www.cenicana.org/pdf_privado/informe_anual/ia_2019/ia_2019.pdf

Cenicaña (2019). *Variedad CC 05-430*. Folleto. Servicio de Cooperación Técnica y Transferencia de Tecnología-Cenicaña.

- Cheema, K.L. y Hussain, H. (2004) *Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud*. International Journal of Agriculture y Biology 6(2): 257-259.
- De Feria, M., Jiménez, E. y Chávez, M. 1998. *Influencia de la densidad de inóculo y la renovación del medio de cultivo en la propagación in vitro de la caña de azúcar (Saccharum officinarum) utilizando sistema de inmersión temporal*. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REBIO'98. 1-5 junio, La Habana, Cuba. Libro de Resúmenes, p.42.
- EcuRed. (2017). Organogénesis en Biotecnología Vegetal. 2.
[https://www.ecured.cu/Organog%C3%A9nesis_\(Biotecnolog%C3%ADa_Vegetal\)](https://www.ecured.cu/Organog%C3%A9nesis_(Biotecnolog%C3%ADa_Vegetal))
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Butler and Tanner Ltd, Frome
<https://investigacionfitopatologiaumar.files.wordpress.com/2016/06/plant-propagation.pdf>
- Gómez, J. y Miranda, J. (2009). *Manejo agronómico de la caña panelera con énfasis en el control biológico*. Bogotá. Federación nacional de productores de panela. (Fedepanela) pp.
- Kay Thi, O. O., Htwe, M. M., & San, N. N. (2018). *In vitro* regeneration of sugarcane (Saccharum officinarum) varieties GUI 11 and PMA 96/48. Journal of Scientific and Innovative Research, 7(1), 7-11. DOI: 10.25047/agriprima.v4i2.375
- Leifert, C, Murphy K P y Lumsden PJ (1995) Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. Critical Reviews in Plant Sciences, 14(2): 83-109

López, C. Á., Vega, W. O., Gómez, M. C. y Montoya, M. M. (2014). *Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes*. Costa Rica: Agron. Mesoam. 25(2):225-241.

<https://www.redalyc.org/pdf/437/43731480002.pdf>

Martínez, J. C. (2012). *Propagación y técnicas de cultivo de la Caña de azúcar (Saccharum officinarum)*. Revista Vinculando.

<https://vinculando.org/mercado/agroindustria/propagacion-y-tecnicas-de-cultivo-de-la-cana-de-azucar-saccharum-officinarum.html>.

Medeiros M, Cabral E, Mota Lima GV, Willadino L, Camara T (2015) *In vitro propagation in Temporary Immersion System of sugarcane plants variety 'RB 872552' derived from somatic embryos*. Biotecnología Vegetal 15(3): 187-191

<https://biblat.unam.mx/es/revista/biotecnologia-vegetal/articulo/in-vitro-propagation-in-temporary-immersion-system-of-sugarcane-plants-variety-rb-872552-derived-from-somatic-embryos>

Mekonnen, T., Diro. M., Sharma. M. y Negi. (2014) *Protocol optimization for in vitro mass propagation of two sugarcane (saccharum officinarum L.) clones grown in Ethiopia*. African journal of biotechnology. DOI: 10.5897/AJB2013.13575

Moreno, B., y Victoria, G. (1991). *Multiplicación por cultivo in vitro*, tesis (Universidad nacional de Colombia, Cenicaña.

https://www.cenicana.org/pdf_privado/documentos_no_seriados/libro_el_cultivo_cana/libro_p115-129.pdf

Mulugeta, H. M., Chimdessa. M. y Muthswamy. M., (2018) *In vitro* Propagation of Selected Sugarcane (*saccharum officinarum* L.) Varieties (C 86-165 and C 86-12) Through Shoot Apical Meristem. <https://symbiosisonlinepublishing.com/horticulture-agriculture/horticulture-agriculture15.pdf>

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nickell, L. G. (1964). *Tissue and cell culture of sugarcane: another research tool*. Hawaii Plant Rec 57: 223-229. <https://doi.org/10.1007/BF02318913>

Ojeda, J. L. (2014). *Plan de mercadeo de los productos derivados de la panela de la empresa don José del municipio de la unión Nariño año 2014-2019*. Universidad de Nariño.

<https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/4351/1/Evaluaci%C3%B3n%20del%20cultivo%20in%20vitro%20de%20ca%C3%B1a%20de%20az%C3%BAcar%20%28Saccharum%20officinarum%29%20VAR.%20CCSP%2089-43%20a%20partir%20de%20meristemas%20apicales%20mediante%20la%20t%C3%A9cnica%20de%20organog%C3%A9nesis..pdf>

Olmos, G. L. (2015). *Métodos de propagación y conservación de germoplasma. PARTE IV; Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, 353 - 355. https://chilebio.cl/wp-content/uploads/2015/12/Parte_IV.pdf

- Osorio, G. (2007). *Manual: Buenas Prácticas Agrícolas -BPA- y Buenas Prácticas de Manufactura -BPM-en la Producción de Caña y Panela*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO. Pag 53.
https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/57494/Trabajodegrado_GabrielaAmorocho.pdf?sequence=1
- Pandey, R. N., Rastogi, J., Sharma, M. L. y Singh, R. K. (2011). *Technologies for cost reduction in sugarcane micropropagation*. African Journal of Biotechnology 10(40): 7814-7819; doi: 10.5897/AJB10.234.
- Pathak, S., Lal. M., Tiwari. A. Sharma M. (2009) *Effect of growth regulators on in vitro multiplication and rooting of shoot cultures in sugarcane*. Sugar Tech.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12355-009-0017-5>
- Pérez, B. M., Vega, M. V., Delgado, T. M., Torres, L. J., Pino, S. A., Cabrera, R. A., Toledo, B. M., García, B. Y. y Ortiz, O. A. (2013). *Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda*. Revista Colombiana de Biotecnología, ISSN-e 1909-8758, ISSN 0123-3475, Vol. 15, N.º 1. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752013000100010
- Pérez, M. B., Vega, V. M., Delgado M. Torres., Torres, J. L., Pino, A. S., Cabrera A. R., Toledo, M. B., García, Y. B. y Ortiz, A. O. (2011) *Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda "INIVITPV"(AAB)*. Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales

(INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53000, Villa Clara, Cuba. DOI:
10.5897/AJB2016.15390

Pierik, L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa. Madrid,
España

https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=+Cultivo+in+vitro+de+las+plantas+superiores&author=Pierik+L.+M.&publication_year=1990.

Procaña. (2015). *Historia de la Caña de Azúcar*. Cali, Colombia. Asociación colombiana de productores y proveedores de Caña de Azúcar. <https://procana.org/site/>

Rangel, E. E., Hernández, E.M., Hernández, M. A., (2016) *Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México*

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000300225&lng=es&tlng=es

Reyes, O. E. S., Orozco, M. C. A., & De la cruz Cardona, C. A. (2015). Contribución de *Vigna unguiculata* L. a la sustentabilidad de sistemas de cultivo de caña de azúcar. *RIAA*, 6(2), 47-56. <https://doi.org/10.22490/21456453.1404>

Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura:*

Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT. 970p. [http://ciat-](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)

[library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)

SIANEC. (s.f.). *Ficha Técnica de la caña de azúcar*. Obtenido de Asociación Nacional de Empresas Comercializadoras de Productos del Campo:
<http://siafemor.inifap.gob.mx/anec/ficha-tecnica-cana.php>.

Tesfa, M., Admaassu., B. y Bantte., K. (2016) *Enraizamiento y aclimatación in vitro de genotipos micropropagados de caña de azúcar Elite (Saccharum officinarum L.) - N52 y N53*. Jouenal of Tissue Science and Engineering.
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7552.1000153>

Victoria, J I y Calderón, H. (1995) *Establecimiento de semilleros y multiplicación de variedades. Cali, Colombia*. Cenicaña: el cultivo de la caña de azúcar en zona azucarera de Colombia p.115-129.
https://www.cenicana.org/pdf_privado/serie_tecnica/st_23/st_23.pdf

Villamizar, E. A. (2005). *Estandarización del protocolo in vitro para el establecimiento de encenillo (weinmannia tomentosa h.b &k.) y de rodamonte (escallonia myrtilloides l.f) en el laboratorio de cultivos de tejidos del jardín botánico José celestino mutis*. Cúcuta, Colombia. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis.
https://oab.ambientebogota.gov.co/?post_type=dlm_download&p=4067

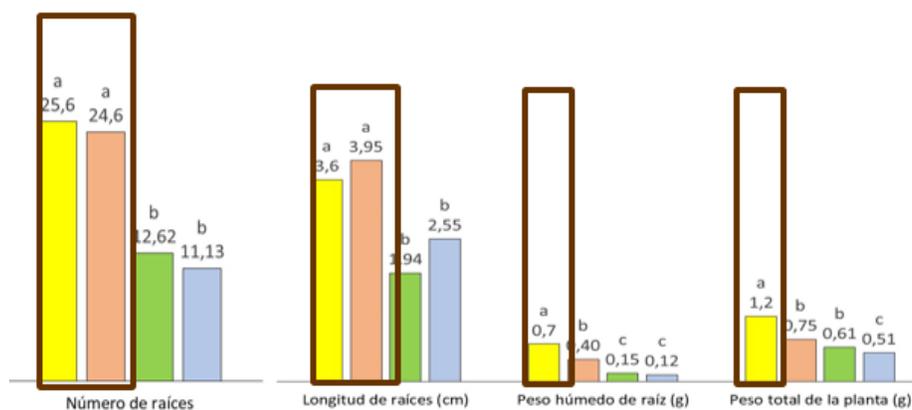
Yadav S, Ahmad A, Rastogi J, Lal M (2015) *Effect of propagule trimming on shoot multiplication rate in sugarcane micropropagation*. J Sugarcane Research 4(1): 82-85
https://www.researchgate.net/publication/318786920_EFFECT_OF_SUBCULTURING_PERIOD_ON_SHOOT_MULTIPLICATION_RATE_IN_SUGARCANE_MICROPROPAGATION.

Anexos

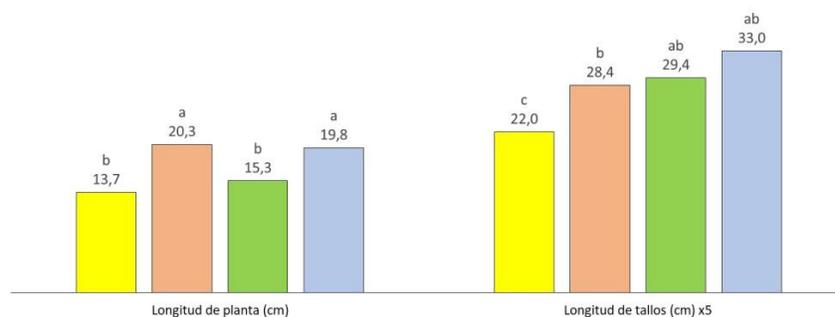
Anexo 1. Medios de cultivo con los componentes y cantidades.

	<p>Cenicaña = 25 g sacarosa + 5 mg ANA + 0,1 mg kinetina + 4,43 g Sales</p>
	<p>Medio 1 = 25 g sacarosa + 3 mg ANA + 0,1 mg Kinetina + 4,43 g Sales</p>
	<p>Medio 2 = 25 g sacarosa + 3 mg ANA + 0,1mg Kinetina + 2,215 g Sales</p>
	<p>Medio 3 = 50 g sacarosa+ 3 mg ANA + 2,215 g Sales</p>

Anexo 2. Graficas de los medios de enraizamiento según las variables evaluadas del desarrollo de raíces.



Anexo 3. Variables de evaluadas para el desarrollo de la planta en los medios de enraizamiento.



Anexo 4. Análisis de varianza.

Variable	g.I N	g.I D	F	P	Signif.	Análisis
						F = 44,93; g.l. = 3, 236; P <
NR	3	236	44,93	< 0.0001	***	0.001
						F = 22,92; g.l. = 3, 236; P <
LR	3	236	22,92	< 0.0001	***	0.001
						F = 15,19; g.l. = 3, 236; P <
LT	3	236	15,19	< 0.0001	***	0.001
						F = 17,17; g.l. = 3, 236; P <
LP	3	236	17,17	< 0.0001	***	0.001

PHR	3	236	36,96	< 0.0001	F = 36,96; g.l. = 3, 236; P <
				***	0.001
	3	236	19,02	< 0.0001	F = 19,02; g.l. = 3, 236; P <
PTP				***	0.001
	3	236	25,15	< 0.0001	F = 25,15; g.l. = 3, 236; P <
PSR				***	0.001
