



Escuela Superior Politécnica del Litoral
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales

Obtención de una nueva variedad de caña de azúcar
(*Saccharum spp*) mediante la aplicación de técnicas de
cultivo de tejido *in vitro* para enfrentar el cambio
climático.

TESIS DE POSTGRADO

Previo a la obtención del Título de:
MASTER EN CAMBIO CLIMATICO

Presentado por:

Blga. Ana Arellano Litardo

Guayaquil - Ecuador

Año - 2015

AGRADECIMIENTO

A Dios, ser supremo que tiene el control de todo y dueño de mi vida, que cada día me da la fortaleza que necesito para seguir adelante y a cumplir las metas propuestas.

Mi agradecimiento a la UNION NACIONAL DE CAÑICULTORES DEL ECUADOR (UNCE) que a través de su Centro de Investigaciones y Desarrollo de la Caña de la Azúcar, donde he podido realizar el presente trabajo en beneficio de los cañicultores ecuatorianos. Al Presidente de la UNCE Sr. Astolfo Pincay Flores por su aporte para realización del mismo.

Al MSc. Jerry Landívar, al MSc. Carlos Burbano y al Dr. Miguel Ramos-Leal por su ayuda incondicional para elaboración de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres por ser un pilar fundamental en mi vida, por estar siempre a mi lado apoyándome en todo e impulsando para que pueda cumplir mis objetivos.

A mí estimada maestra y amiga la Dra. Sofía Korneva (†), ser humano extraordinario que Dios puso en mi camino y de quien pude aprender a lo largo de estos años sobre Biotecnología.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Dr. J. Luis Santos Dávila
PRESIDENTE

M. Sc. Jerry Landívar Zambrano
Director de tesis

Dra. Alba Calles Procel
Primer vocal

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”.

Ana Colombia Arellano Litardo

RESUMEN

La obtención de nuevas variedades por métodos convencionales toma de 10 a 12 años, sin embargo, aplicando métodos biotecnológicos como el mejoramiento genético, se puede lograr nuevas variedades en un periodo menor a 10 años. Este trabajo comprende la obtención de nuevos individuos, explotando la variación somaclonal de cultivo de callos, la identificación bioquímica de variedades mediante patrones electroforéticos de isoenzimas peroxidasas y el uso de marcadores moleculares basados en la amplificación del ADN mediante la PCR. Se regeneraron un total 15.000 somaclones de las variedades Ragnar y CC 85-92, las cuales fueron aclimatadas en invernadero y resembradas al campo; tres de los cuales (03,04,05) mostraron mejores caracteres y rendimiento en TCH que las variedades donantes durante los años evaluados 2012, 2013, 2014. Los análisis de PCR permitieron demostrar la diferenciación del somaclon 03 al visualizar una banda menos comparándolo con el testigo la CC 85-92. Así también este clon soporto días de encharcamiento, pues al sembrar los clones y su testigo en terreno donde no había un buen drenaje, éste soporto 8 días consecutivos con agua, con una sobrevivencia de un 75%. Lo que permite predecir que podría soportar periodos de inundaciones a los que la planta suele tolerar de 2 a 3 días.

Estos resultados mostraron la posibilidad de obtener nuevas variantes somaclonales de caña de azúcar, que han logrado mantenerse con mayor rendimiento agrícola que el cultivar donante. Pero además contar con individuos que pueden tolerar las variaciones climáticas, logrando que estas se adapten con mayor facilidad al cambio climático lo cual resulta muy beneficioso para este sector agrícola del país.

INDICE GENERAL

	Paginas
RESUMEN.....	I
INDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XI
GLOSARIO.....	XII
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1	
1. GENERALIDADES.....	3
1.1 ANTECEDENTES.....	3
1.2 Variación somaclonal in vitro para obtención de nuevos genotipos.....	5
1.2.1. Técnicas de propagación mediante cultivo de tejidos.....	5
1.2.1.1. Organogénesis directa.....	6
1.2.1.2. Organogénesis indirecta.....	6
1.2.1.3. Embriogénesis somática.....	6
1.2.2. Medios de cultivos.....	7
1.3 Cambios climáticos.....	7
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1. Objetivo general.....	8
1.4.2. Objetivos específicos.....	9

CAPÍTULO 2

2	MATERIALE Y MÉTODOS.....	10
2.1.	Localización geográfica.....	10
2.2.	Inducción de callos embriogénicos.....	11
2.3.	Análisis Morfológicos.....	13
2.3.1.	Selección de individuos con mejores características.....	13
2.4.	Evaluación de producción agrícola de somaclones... ..	14
2.4.1.	Siembra de lotes replicados.....	14
2.4.2.	Determinación de la influencia de las variaciones climáticas en la Producción de caña de azúcar en el Sector Aztra.....	14
2.5.	Caracterización bioquímica y molecular.....	16
2.5.1.	Métodos Bioquímico.....	16
2.5.1.1.	Análisis mediante Isoenzimas peroxidadas.....	16
2.5.2.	Métodos Moleculares.....	17
2.5.2.1.	Uso de marcadores moleculares basados en amplificación del ADN.....	17

CAPÍTULO 3

3.	RESULTADOS	18
3.1	Plantas obtenidas.....	18
3.2.	Análisis de métodos Agro-morfológicos.....	19
3.2.1.	Selección de individuos con mejores caracteres variedad CC85-92... ..	19
3.2.2.	Selección de individuos con mejores caracteres de la variedad	

Ragnar.....	23
3.3. Análisis de azucarería y producción agrícola.....	25
3.3.1 Análisis de azucarería.....	25
3.3.2 Análisis de índice de madurez.....	25
3.3.3 Producción Agrícola.....	27
3.4. Caracterización bioquímica y molecular.....	29
3.4.1. Métodos Bioquímicos.....	29
3.4.1.1. Análisis mediante (Isoenzimas Peroxidasas).....	29
3.4.2. Métodos Moleculares.....	30
3.4.2.1. Análisis mediante PCR.....	30
3.5. Análisis de la producción en función del tiempo en años y las variables	
Climáticas.....	32
3.5.1. Análisis de la variación de la producción de caña de azúcar de 20	
productores de caña de azúcar entre los años 2008 y 2014.....	32
3.5.2. Análisis de la correlación entre la variación climatológica de la zona y	
los rendimientos promedios de caña de azúcar de los productores	
evaluados.....	34
CAPÍTULO 4	
4. CONCLUSIONES Y DISCUSIONES.....	40
RECOMDACIONES.....	43
APENDICES.....	44
BIBLIOGRAFÍAS.....	54

IINDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura1 a) Corte de hojas primordiales, b) Callos neoformados en presencia de 2-4D.....	11
Figura 2 a) Callos embriogénicos en proceso de regeneración de plantas b) Plantas regeneradas a partir de callos. UNCE, 2006.....	12
Figura 3 Plantas obtenidas a través de callos embriogénicos, sembrados en invernadero para su adaptación a campo. a) Fase I, b) Fase II.....	19
Figura 4 Lote replicado # 1, en estudio para la selección de clones con mejores caracteres. UNCE, 2012.....	29
Figura 5 Electroforesis de isoenzimas peroxidasas de la variedad donante y somaclones en estudio de caña de azúcar: 1)vacía; 2)Clon 01; 3) Clon 02; 4) Clon 03; 5) Clon 04; 6) Clon 05; 7) Clon 06; 8) Clon 07; 9) Clon 08; 10) Clon 09; 11) CC85-92.....	30
Figura 6 Patrones de amplificación de ADN basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Electroforesis en gel de agarosa al 2%, se emplearon cebadores microsatélite: Carriles 1: Blanco; 3: CC 85-92; 4: clon 04; 5: clon 03; 6: clon 05.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I Siembra de clones en campo para estudio de lotes replicados	14
Tabla II Evaluación de parámetros de brix refractométrico de clones de la variedad CC85-92 y sus testigos. UNCE.2008.....	20
Tabla III Brix refractométrico de clones seleccionados, de la variedad CC 85-92 UNCE, 2010.....	23
Tabla IV Parámetros de caracteres más destacados en plantas de caña de azúcar sembrados en lotes replicado # 1. UNCE, 2012 Análisis de azucarería de los clones destacados (6 agosto/2012)	25
Tabla V Índice de madurez evaluado el 3 septiembre del 2012, cantero de 12 meses de edad, Lote # 1.....	26
Tabla VI Medias de los caracteres evaluados en lotes replicados 1 y 2 evaluación realizada julio del 2012.....	27

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Grafico 1 Curva de madurez de los 10 clones seleccionados con 2 testigos, en la que se puede observar que los clones tiene mejor brix que los testigos. UNCE, 2008.....	21
Grafico 2 Curva de madurez de los clones promisorios de la variedad CC 85-92. UNCE, 2010.....	22
Grafico 3 Curva de madurez de clones seleccionados de la variedad Ragnar. UNCE, 2009.....	24
Grafico 4 Curva de madurez de clones promisorios con mayor grado brix de la variedad Ragnar y su testigo, UNCE, 2010.....	24
Grafico 5 Producción de clones de caña de azúcar (TCH) evaluadas durante 3 años de cosecha, lotes replicado # 1. UNCE, 2014	28
Grafico 6 Producción de clones de caña de azúcar (TCH) evaluados durante 3 años de cosecha. lotes replicado # 2 UNCE, 2014	28

GLOSARIO

Brix. Porcentaje de sólidos disueltos en una base peso por peso, medida con refractómetro o un medidor de densidad.

Electroforesis. Cualquiera de las diversas técnicas para la separación de las macromoléculas basada en su migración en un gel u otro medio sometido a un fuerte campo eléctrico.

PCR. (Reacción en cadena de la polimerasa). Técnica para amplificar un segmento específico de DNA en una mezcla compleja mediante múltiples ciclos de síntesis de DNA a partir de oligonucleótidos cebadores cortos, seguidos por un breve tratamiento de calor que separa las hebras complementarias.

Genotipo. Constitución genética, latente o expresada, de un organismo, a diferencia del fenotipo; suma total de los genes presentes en un individuo. Conjunto de genes de un individuo incluido su composición genética.

PoI. Medida del grado de rotación de la luz polarizada a través de una cantidad conocida de jugo clarificado, que estima el contenido de sacarosa.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ACSA. Asociación de Cañicultores Sector Aztra

UNCE. Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador

INTRODUCCION

En las últimas décadas las variaciones climáticas son muy adversas a nivel mundial lo que está causando serios problemas en la agricultura y cuantiosas pérdidas en la producción agrícola. Es así que durante el periodo 1997-1998, fueron muchos los daños causados por el fenómeno conocido como El Niño Oscilación del Sur (ENOS), debido a las excesivas precipitaciones en países rivereños como Perú, Ecuador y Chile. Solamente para la región andina que abarca Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela el monto de los daños se ha estimado en 7.500 millones de dólares. (6). Este aumento de fenómenos extremos incrementó 2,4 veces las inundaciones, las sequías y los desplazamientos de tierras, aunque algunos de estos fenómenos podrían estar relacionados con ENOS. Estas variaciones de intensidad y frecuencias de los fenómenos extremos acentuará la vulnerabilidad de la agricultura de América Latina y el Caribe al Cambio Climático. (3).

Según la FAO, la seguridad alimentaria de las personas y países pobres, bien podría verse reducida por el cambio climático. Incluso en 2030, centenares de millones de personas que estarán desnutridas o al borde de la desnutrición. Serán especialmente vulnerables a la perturbación de sus ingresos o suministro de alimentos por pérdidas de las cosechas o acontecimientos extremos como sequías e inundaciones (11).

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) híbrido de tipo C4, es el cultivo más productivo hasta ahora aprovechado en varias partes del mundo, proporciona alrededor del 75% del azúcar producido en el mundo para el consumo humano. (13). Este al igual que otros cultivos, está siendo seriamente afectado por el cambio climático, el cual conlleva a la aparición y/o re-emergencia de nuevas plagas y enfermedades que ocasionan serias pérdidas en la producción, poniendo en peligro la industria nacional (7). Ejemplo de esto fue la aparición en el año 2009 de la roya parda (*Puccinea melanocephalla*) en áreas cañeras de la provincia de Loja y más recientemente, la aparición en el año 2011 de la enfermedad roya naranja (*Puccinia kuehni*) (12).

El cambio climático impone retos al desarrollo humano en el mundo moderno, dado por la necesidad de abastecer la demanda mundial de alimento. En este sentido, el mejoramiento genético de la caña de azúcar está dirigido a la obtención de nuevas variedades con un mayor rendimiento agrícola, azucarero y que se adapten a las variaciones climáticas del país, es decir, que expresen mecanismos de adaptación general y específico que permitan vencer el estrés biótico relacionado con la aparición de nuevas plagas y enfermedades, así como estrés abióticos. Para alcanzar estos objetivos, se hace necesario, como uno de los primeros pasos de los programas de mejora genética, conocer la cantidad y distribución de la variación genética presente entre las especies cultivadas. Esta diversidad genética se encuentra conservada en las colecciones de germoplasmas.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1. ANTECEDENTES

El Ecuador es un país donde la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) tiene alrededor de 135.000 Ha sembradas, dedicadas a la producción de azúcar, etanol, panela, aguardiente (17). Este cultivo es de gran importancia económica para el país, pues está aportando buenas divisas, es así que en el año 2012 se exportaron 6.817,19 TM a un valor de FOB USD 6'764.290 (Banco Central del Ecuador) (Apéndice A). En el Ecuador se cultiva caña de azúcar en todo el país y entre sus ventajas cuenta ser un país con las características de un clima apropiado para una larga zafra, a pesar de esto posee el inconveniente de una estrecha base genética, a lo que se suma el número reducido de variedades comerciales en explotación.

La producción de caña de azúcar se incrementó a una tasa de variación anual promedio de 6,26% (Apéndice A). El mayor volumen se registró en 2008, cuando con un crecimiento de 11,29% llegó a 9'241.095 TM, con un rendimiento de 96,14 TM/Ha. Para el 2010, la Costa concentró el 79,99% de la producción nacional, seguida por la Sierra con 20,01% (16).

La biotecnología puede ser una gran ayuda en el desarrollo de variedades de cultivos capaces de sobrevivir a entornos difíciles. Ya se han conseguido resultados prometedores en el desarrollo de variedades con características complejas como resistencia o tolerancia a la sequía, a la salinidad del suelo, a plagas y enfermedades. (11)

Una alternativa que puede ser viable para la obtención de nuevas variedades en caña de azúcar, es el uso del regulador de crecimiento 2,4D (auxina) el mismo que es utilizado para la obtención de callos, los cuales sirven para la regeneración de plantas a partir de tejidos vegetales, con el fin de inducir mutagénesis y obtener nuevas variedades. El 2,4-D ejerce una acción especial en las plantas, actuando como regulador de multiplicación celular a bajas concentraciones. (26).

El análisis del polimorfismo para peroxidasas en variedades de caña de azúcar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, permite revelar el polimorfismo de bandas diferente, para cada una de las variedades en estudio con y sin presencia del mutagenico. Demostrando la capacidad del 2,4-Diclorofenoxiacetico para inducir

callos y generar variación genética. Sin embargo, este efecto depende de su concentración en el medio y la capacidad de respuesta de la variedad empleada. (23)

Los cañicultores de la cuenca baja del Guayas están sumamente preocupados por las variaciones climáticas que se están dando en este sector del país, las cuales están afectando considerablemente la producción agrícola y por ende su economía. Esto lo han visto reflejado en las zafra del 2013, pues las pérdidas en producción fueron de un 25% en rendimiento (2)

En su mayoría los cañicultores concluyen que necesitan variedades que puedan tolerar estas anomalías climáticas, pero sobre todo que mantengan el rendimiento agrícola, pues antes sus cultivos se mantenían de 5 a 8 años sin tener que renovar sus campos de caña. (Morales, comunicación personal, 11 de diciembre de 2013).

1.2. Variación somaclonal in vitro para obtención de nuevos genotipos

1.2.1 Técnicas de propagación mediante cultivo de tejidos.

Las técnicas de cultivo de tejido son ampliamente utilizadas a nivel mundial en la propagación de plantas y están dando excelentes resultados en la producción agrícola.

El cultivo in vitro es un procedimiento eficaz de clonación de plantas que no se propagan de forma natural y proporciona nuevas técnicas como son: uso de variación somaclonal, cultivo de anteras, fusión de protoplastos, rescate de embriones

para ampliar límites de cruzamientos, selección in vitro para detectar resistencia a una toxina o a un estrés ambiental. (5)

1.2.1.1 Organogénesis directa

Consiste en la regeneración de plantas sin raíces directamente del explante, esta recta generalmente se sigue cuando se usa meristemos vegetativos terminales o laterales. (27)

1.2.1.2 Organogénesis indirecta

El explante genera la formación de una masa indiferenciada de células llamada callos a partir de estas se forman embriones somáticos, del cual se obtiene plántulas según sea la especie y las hormonas utilizadas. Este es el caso de secciones de tallo, hoja, raíz o protoplastos. (27)

1.2.1.3 Embriogénesis somática

Es un proceso muy frecuente en el cultivo in vitro de especies vegetales, este proceso consiste en obtener una estructura similar a un embrión cigoto que mide la fertilización de los gametos. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o grupos de células. (19)

1.2.2 Medios de cultivo

El Conjunto de elementos abióticos (físico - químicos) que integran la sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida o líquida) que suministra anclaje, nutrición y la estimulación de desarrollo al explante, y se agrupan en sólidos, semisólidos y líquidos. (26)

1.3. Cambios climáticos

El clima es la base fundamental para el desarrollo de todo cultivo ya que incide directamente sobre el desarrollo de la planta provocando un mayor o mejor rendimiento. Cada región tiene su clima característico y de este depende el poder cultivar una u otra especie, puesto que cada una se comporta y tiene sus requerimientos diferentes.

El suelo y el clima son variables que en las diferentes regiones y estaciones afectan en gran medida el manejo del cultivo de la caña de azúcar y su rendimiento, lo que resulta en una alta heterogeneidad entre los canteros. Estas heterogeneidades son más evidentes en condiciones de temporal, cuando el estrés hídrico puede ocurrir con mayor frecuencia. (19).

Por ejemplo la caña de azúcar es un cultivo que necesita muchas horas luz para obtener una mayor concentración de azúcar (Pol) este dependerá de cuantas hora luz tenga la misma.

Muchos países ya están sufriendo las repercusiones del cambio climático en forma de una pluviometría irregular e impredecible, un aumento de la incidencia de las tormentas y sequías prolongadas. El cambio de las condiciones meteorológicas también favorece la aparición de plagas y enfermedades que afectan a cultivos y animales. (10)

Todas estas variaciones climáticas en agricultura podrían tener como resultado la desnutrición, el hambre y una escasez de alimentos de gran amplitud. Lo que podría desencadenar conflictos en las comunidades y hacer que las poblaciones huyan de las regiones en las que falte el sustento. (27)

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Inducir mutagénesis somática mediante la obtención de callos embriogénicos para la producción de clones promisorios de caña de azúcar con tolerancia a los efectos del cambio climático en áreas cañeras del Ecuador.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Desarrollar el proceso de variación somaclonal in vitro a partir de primordios foliares del verticilo apical mediante la obtención de callos embriogénicos de dos variedades (Ragnar y CC85-92) de caña de azúcar.
2. Regenerar plántulas a partir de los callos embriogénicos obtenidos de las variedades en estudio.
3. Caracterizar mediante métodos agro-morfológicos, la diversidad genética derivada de los procesos antes descritos.
4. Determinar la influencia de las variaciones climáticas en el cultivo de caña de azúcar en el Sector Aztra.

CAPÍTULO 2

MATERIALES y MÉTODO

2.1. Localización geográfica

La investigación fue realizada en el Centro de Investigación y Desarrollo de la Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE), ubicado en el Cantón El Triunfo Km. 53 Vía Duran Tambo, Provincia del Guayas, sector Agua Santa. Con una temperatura promedio anual de 29°C, precipitación media anual de 1202.2 mm, con humedad relativa del 80.1% y una altura de 60 msnm. (15).

Las variables registradas en el ensayo, fueron obtenidas de canteros ubicados en el denominado "Sector Aztra", el cual comprende las localidades de los cantones: El Triunfo, La Troncal, Cumandá y Gral. P. J. Montero.

2.2. Inducción de callos embriogénicos

Para la obtención de nuevas variedades de plantas, las hojas primordiales de caña de azúcar de (8-9 meses de edad) del verticilo apical (figura 1a) previamente desinfectadas con cloro al 2%, se cortaron en pedazos de 0.5 cm de altura y se sembraron, en condiciones asépticas empleando gabinete de seguridad; en medio de cultivo MS modificado (20) y en presencia de la auxina sintética ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 3 mg.L^{-1} , la cual conduce al crecimiento desordenado de células del tejido aislado, induciendo la formación de **callos** (figura 1b).



Figura 1.- a) Corte de hojas primordiales b) Callos neoformados en presencia de 2-4D

Por este método se pueden obtener nuevas variedades explotando la llamada “variación somaclonal” (18)

Una vez sembrados los frascos con las hojas primordiales, éstos se colocaron en cuarto oscuro y en un lapso de 30 días se formaron unas masas indiferenciadas de células llamadas callos, estas estructuras logradas se multiplicaron durante 3 meses, resemebrándolos cada 30 días. Posteriormente fueron resemebradas, en otro medio de cultivo sintético en ausencia de las fitohormonas y en presencia de luz; para que se formen los brotes de la caña de azúcar (Figura 2a) los cuales comenzaron a germinar a los 20 días de efectuarse la resiembra, las pequeñas plántulas (Figura 2b) se sembraron en un medio de enraizamiento hasta después de 30 días y una vez que habían formado por completo sus raíces fueron sembradas en condiciones controladas de invernadero para su endurecimiento y climatización a campo.



Figura 2. a) Callos embriogénicos en proceso de regeneración de plantas b) Plantas regeneradas a partir de callos. UNCE, 2006.

Tres meses después, las plantas de caña de azúcar ya adaptadas a las condiciones naturales fueron resemebradas al campo para su posterior evaluación.

2.3. Análisis Morfológicos

2.3.1. Selección de individuos con mejores características.

Los clones obtenidos fueron sembrados en campo y a los 8 meses de edad se comenzaron a evaluar caracteres fenotípicos más heredables y a seleccionar los individuos con mejores características visibles sin síntomas de alguna enfermedad o ataque de plaga.

El proceso de selección inicial se llevó a cabo desde el año 2007 en adelante con un proceso de selección de somaclones provenientes de las variedades CC85-92 y Ragnar.

Para dicho muestreo fueron analizados tres tallos de cada clon seleccionado, tomando en consideración el promedio general de tres muestras analizadas.

La selección y caracterización morfológica para los somaclones en condiciones de campo y considerando los caracteres por su máxima heredabilidad son: Brix, longitud del tallo (LTA) y diámetro del tallo (DTA) Pérez y Col., (1997).

Las tomas de muestra para medir el brix se realizaron pinchando el segundo tercio del tallo de la planta y colocando una pequeña cantidad del jugo de caña en el refractómetro manual. Para dicho muestreo fueron analizados 3 tallos de cada clon seleccionado, tomando en consideración el promedio general de 3 tomas analizadas.

2.4 Evaluación de producción agrícola de somaclones

2.4.1. Siembra de lotes replicados

Una vez seleccionados los clones con caracteres destacados, en el año 2011 se plantaron en “lotes de estudios replicados” utilizando un diseño de bloques completos al azar en diferentes sectores del Cantón El Triunfo, en los cuales se evaluaron los caracteres de las primeras evaluaciones tales como: grados Brix, DTA, LTA; y adicionalmente se midió el Pol, y la producción agrícola de TCH de los clones en estudio con sus respectivos testigos.

Las unidades experimentales estaban compuestas de 4 surcos de 12.5m de longitud y espaciados 1.5m entre cada surco y una separación de 0.70m entre cada unidad experimental. El área total de estudio fue de 750 m².

Tabla. I Siembra de clones en campo para estudio de lotes replicados.

Lote replicado # 1				
2	4	6	8	10
Clon 03	Clon 02	Clon 01	Clon 04	Clon 08
1	3	5	7	9
clon 07	Ragnar	CC 85-92	Clon 05	Clon R5

Lote replicado # 2

2	4	6	8	10
Ragnar	CC 85-92	Clon 08	Clon 02	Clon 03
1	3	5	7	9
Clon 04	Clon R5	Clon 07	Clon 01	Clon 05

2.4.2. Determinación de la influencia de las variaciones climáticas en la producción de caña de azúcar en el Sector Aztra.

Para determinar la influencia de las variables climáticas sobre la producción de caña de azúcar se tomaron datos de producción de veinte productores. El análisis fue realizado utilizando un arreglo factorial de medidas repetidas, en donde el factor intra-sujetos son los años (AÑO) y el factor entre-sujetos son los productores evaluados repetidas veces cada año (PRODUCTOR), siendo la producción (PRODUCCION) la variable de respuesta.

Para determinar la influencia de variables climáticas en la producción de caña de azúcar en el "Sector Aztra" se registró las toneladas de caña cosechada de veinte productores de esta localidad durante el período comprendido desde el año 2008 hasta el 2014.

Para tal efecto se tomaron datos meteorológicos obtenidos del INHAMI entre el año 2008 y 2012 de la estación meteorológica INGENIO AZTRA (Cantón La Troncal) ubicada dentro del área geográfica de producción.

Las variables meteorológicas evaluadas fueron las siguientes:

- TASma: Temperatura del aire a la sombra (°C) - media anual
- Hrma: Humedad Relativa mensual (%) - media anual
- PRma: Punto de Rocio (°C) - media anual
- TVma: Tensión de vapor (hPa) - media anual
- Psa: Precipitación (mm) - suma anual
- Esa: Evaporación (mm) - suma anual

2.5 Caracterización bioquímica y molecular

2.5.1 Métodos Bioquímicos

2.5.1.1 Análisis mediante Isoenzimas peroxidasas

Para llevar a cabo este análisis, se empleó la electroforesis en condiciones nativas, empleando un sistema de corrida vertical, usando un gel de separación de poliacrilamida de 8,5 %, con un tampón de corrida de Tris-Glicina 0,04 M a pH 8,3. El método de tinción se basó en el empleo de o-dianisidina, usando peróxido de hidrógeno como sustrato (14)

Para esto se utilizaron plantas de más de seis meses de edad de los clones en estudio con sus respectivos testigos. Se seleccionaron las hojas +3 según la clasificación de Kuijper (Van Dillewijn, (1973). Un gramo de hojas de plantas adultas, desnervadas, cortadas en fragmentos de 1x1cm fueron posteriormente

maceradas en un mortero en el ambiente de nitrógeno líquido (-196°C). Luego se le añadió 5ml de sacarosa al 20% en presencia de 0.025 % de dietil-ditio carbonato de sodio (DECA) (1). El producto obtenido fue filtrado por doble gasa y la savia centrifugada a 4°C durante 30 segundos a 2000 rpm. El sobrenadante fue decantado y envasado en los tubos eppendorf de 2ml de volumen y se conservaron a - 20° C hasta su posterior uso.

2.5.2 Métodos Moleculares

2.5.2.1 Uso de marcadores moleculares basados en la amplificación del ADN.

La caracterización molecular de los somaclones se llevó a cabo a partir del aislamiento del ADN genómico de las cultivares y somaclones en estudio, por el método de Dellaporta et al., (1983). Estos ADN se emplearon como molde para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las amplificaciones se realizaron empleando cebadores de tipo satélite. Las reacciones contenían 50 ng del ADN molde, 0,2 µM de cada dNTP (dATP; dTTP; dGTP; dCTP), 0,5 µM de cada cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa, 10X Taq ADN tampón, 20 µM MgCl₂, en volumen total de 25 µL que se ajustó con agua destilada estéril. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización a 94 °C por 5 minutos. 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante un minuto; anillamiento a 58°C por 1 minuto; extensión a 72 °C por 30 segundos. Se realizó extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% que contenían bromuro de etidio

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Plantas obtenidas

En total, en el laboratorio, fueron neoformadas a partir de callos embriogénicos 10.000 plantas de la variedad CC8592 y 5000 de la variedad Ragnar, las cuales una vez endurecidas en el invernadero (Figura 3) fueron resembradas en campo y evaluados durante tres años para poder seleccionar un clon con una buena producción agrícola, rendimiento azucarero y de ser posible con tolerancia a enfermedades y a variaciones climáticas.



Figura 3.- Plantas obtenidas a través de callos embriogénicos, sembrados en invernaderos para su adaptación al campo a) Fase I, b) Fase II

3.2. Análisis de métodos Agro-morfológicos

3.2.1. Selección de individuos con mejores caracteres de la variedad

CC 85-92

La primera selección de clones destacados (CC8592) fue realizada en agosto de 2007 (caña de 9 meses de edad) de un total de 10.000 plantas sembradas en el campo, de los cuales se seleccionaron 486 clones con características deseadas.

La segunda selección fue realizada de junio – octubre 2008 cuando los clones tenían 6 meses de edad. Con el objetivo de obtener una curva de madurez de los individuos más destacados en la evaluación, se midieron los mismos caracteres analizados en la primera selección (Brix, LTA, DTA) y adicionalmente fueron contados, en el último mes de evaluación, la cantidad de hijos que tenía cada uno de los clones más representativos. En esta evaluación se seleccionaron 72 clones los

cuales fueron sembrados en una nueva parcela para evaluarlos nuevamente y hacer una nueva selección.

De los 72 clones seleccionados se escogieron 10 individuos con un mayor brix refractométrico y 2 testigos de la variedad donante, con los cuales se elaboró una curva de madurez en la que se pudo observar que todos los clones presentaron mayor grado brix que el testigo (Tabla 2, Grafico 1).

Tabla II. Evaluación de parámetros de brix refractométrico de clones de la variedad CC85-92 y sus testigos. UNCE.2008.

Mes	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4	Clon 5	Clon 6	Clon 7	Clon 8	Clon 9	Clon 10	Test.1	Test.2
Jul.	13.00	14.40	11.00	10.00	15.00	15.00	11.00	13.60	11.20	13.40	12.80	12.00
Agos.	14.60	17.00	14.00	13.00	16.20	16.20	12.40	16.00	11.00	18.00	13.00	12.80
Sept.	17.30	19.00	17.00	19.00	18.00	18.50	17.00	17.00	14.00	19.00	14.00	14.30
Oct.	18.30	18.60	18.50	19.00	19.00	18.00	20.00	19.00	19.00	18.50	14.60	15.00

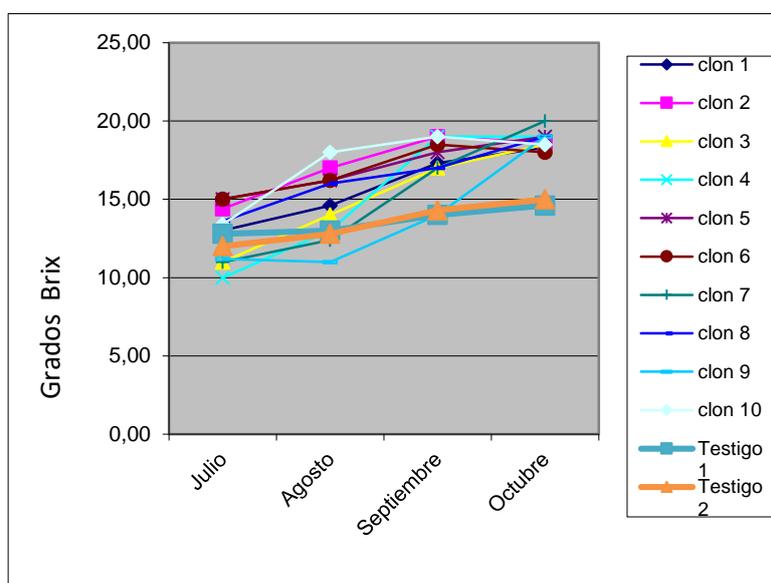


Grafico 1. Curva de madurez de los 10 clones seleccionados con 2 testigos, en la que se puede observar que los clones tienen mejor brix que los testigos. UNCE, 2008.

En noviembre del 2010 se realizó una nueva selección de somaclones, basados en los análisis de resultados obtenidos en los meses de julio, agosto, septiembre y octubre de los años 2009 y 2010, para esa selección se tomaron en cuenta los resultados obtenidos del análisis de grado brix. Aquí fueron seleccionados 8 clones destacados de la variedad CC8592 (Tabla 3) (Grafico 2).

Tabla III. Brix refractométrico de clones seleccionados, de la variedad CC8592. UNCE, 2010.

MES	CLON1	CLON2	CLON3	CLON4	CLON5	CLON7	CLON 8	TESTIG 1	TESTIG 2
JULIO	11	10,33	9	11,33	10	10,66	10,66	8,33	9,66
AGOSTO	11,83	10,83	11,3	12,33	11,33	11,83	11,83	8,66	10,83
SEPTIEMB.	12,66	12	9,66	12,57	11,5	12,66	10,66	10	11,83
OCTUBRE	12,33	10,33	11	13,66	10	9,66	9,33	10,16	8,66

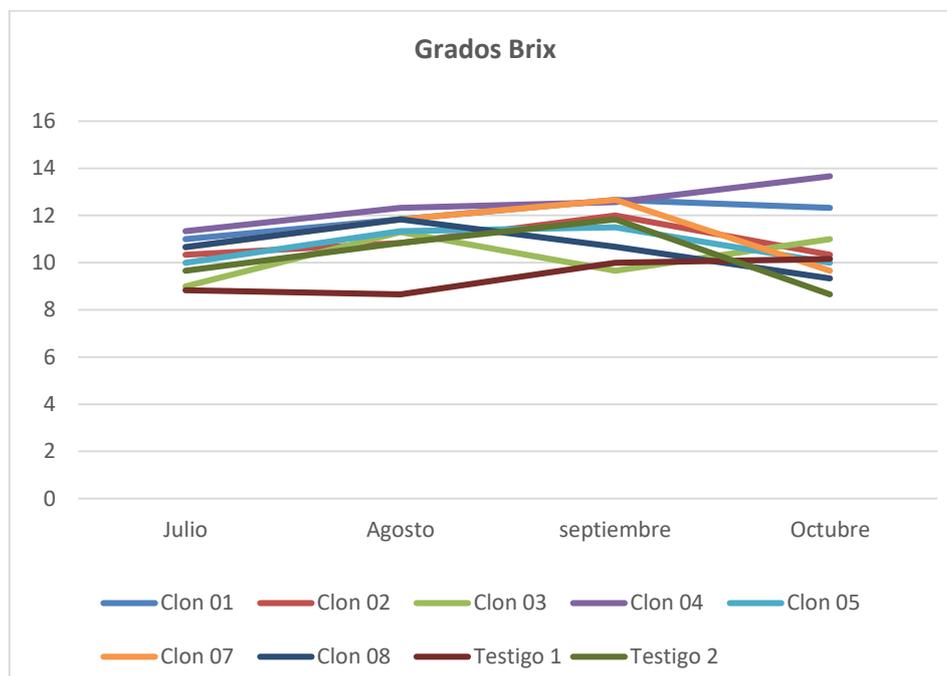


Grafico 2. Curva de madurez de los clones promisorios de la variedad CC8592. UNCE, 2010.

A finales del año 2012 los análisis de Brix, pol y la producción agrícola de las parcelas evaluadas en los lotes clonales, permitió distinguir 4 clones que mostraron un mejor desempeño que el resto (Tabla 4). Estos fueron los clones 03, 04, 05.

La evaluación de los lotes replicados permitió distinguir 3 clones que mostraron un mejor resultado que el resto en estudio. Los clones seleccionados por su mejor desempeño fueron: el clon 03, clon 04 y clon 05.

Tabla IV. Parámetros de caracteres más destacados en plantas de caña de azúcar de somaclones sembrados en lote replicado # 1. UNCE, 2012

PARCELA	SOMACLON	BRIX	DTA	LTA	OBSERVACIONES
7	Clon 05	19.70	2.8	<u>3.13</u>	<i>Resalta entre otros por su altura</i>
10	Clon 08	19,50		3.15	<i>No hay manchas rojas en hojas, ni hijos aéreos</i>
2	Clon 03	<u>20,40</u>	2.75	<u>3.1</u>	<i>No hay síntomas visible de ninguna enfermedad, ni floración</i>
4	Clon 02	20.10	2.8	2.9	<i>No hay manchas rojas en las hojas</i>
8	Clon 04	19.40	<u>3.27</u>	3.0	<i>No hay síntomas visible de ninguna enfermedad, ni floración</i>
1	Clon 07	19.50	2.8	2.9	<i>Ausencia de manchas rojas, ausencia de hijos aéreos</i>
5	CENICAÑA TESTIGO	17.2	2.75	3.0	-
9	Clon 10	20,60	2.9	2.8	-
3	RAGNAR TESTIGO	18.30	3.0	2.55	-

3.2.2. Selección de individuos con mejores caracteres de la variedad Ragnar

De los 5000 clones obtenidos en laboratorio a partir de callos en el año 2006, solamente fueron seleccionados 8 clones en la primera selección año 2008, 3 clones en la segunda selección en el año 2009 (Grafico 3) y en la tercera selección 3 clones año 2010 (Gráfico 4). En los 2 últimos años de evaluación de somaclones solo los clones R1 y R5 mantuvieron sus caracteres destacados.

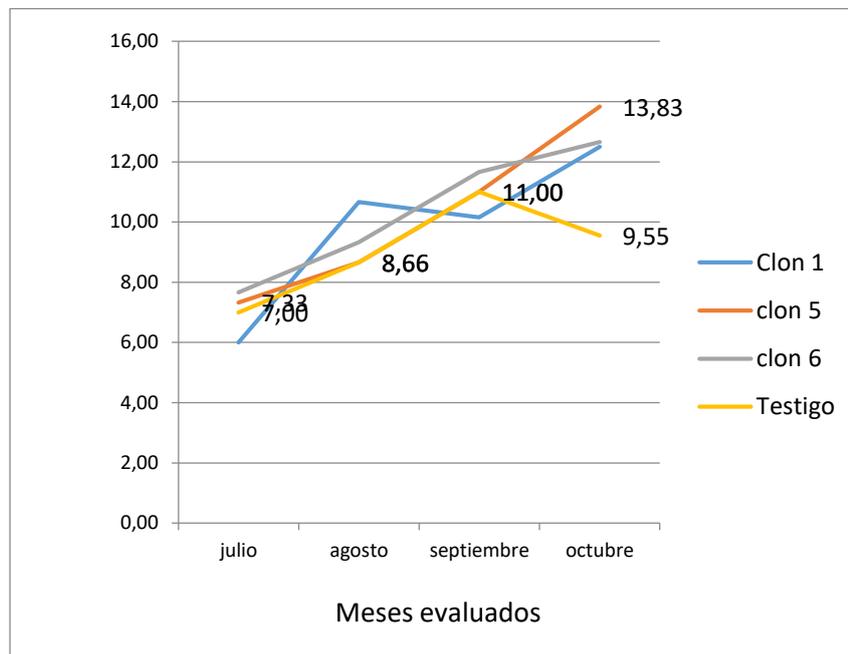


Grafico 3.- Curva de madurez clones seleccionados de la variedad Ragnar. UNCE, 2009

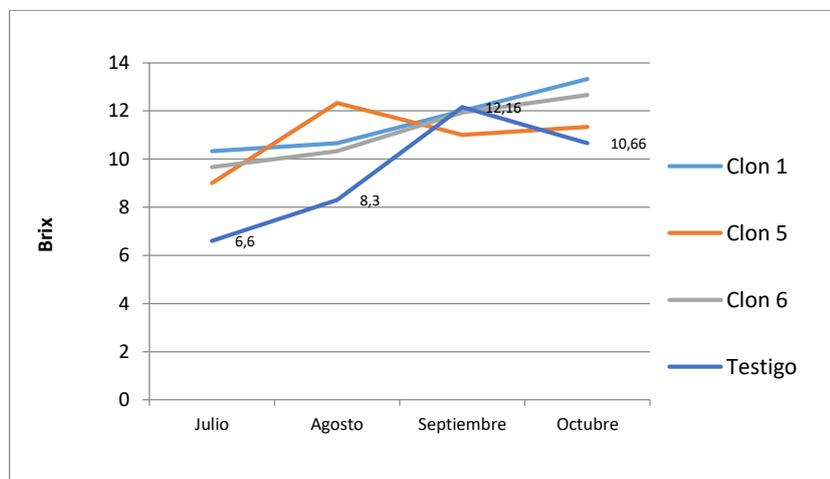


Grafico 4. Curva de madurez de clones promisorios con mayor grado brix de la variedad Ragnar y su testigo, UNCE, 2010.

3.3. Análisis de azucarería y producción agrícola

3.3.1 Análisis de azucarería

En la tabla 4 puede observarse que los somaclones muestran muy buenos valores de Pol, superiores en ambos casos que los mostrados por el donante CC85-92. Hay que señalar que los valores de Brix fueron más bajos que los registrados en condiciones de campo en Julio/2012 (Tabla V).

Tabla V.- Análisis de azucarería de clones destacados (6 agosto/2012)

Genotipos	Brix (%)	Brix observ.	Pol (grado)
1. Clon 03	17.7	17.71	14.57
2. Clon 05	19.4	18.92	<u>15.0</u>
3. CC85-92	17.5	17.38	13.08

Los análisis de azucarería realizados demostraron que todos los somaclones de CC85-92 que se seleccionaron, mostraron mejores resultados que sus donantes

3.3.2 Análisis de índice de madurez

Se pudo determinar el índice de madurez de los clones, como se muestra en la tabla 6.

Este valor se establece de la relación entre (Brixsup/Brixinf.) X 100

Tabla VI. Índice de madurez evaluado el 3 septiembre del 2012, cantero de 12 meses de edad. Lote # 1

Genotipos	Índice de Madurez (%)
1. Clon 05	99,5
2. Clon 02	95,7
3. Clon 03	91,7
4. Clon 07	99,5
5. Clon 08	98,0
6. Clon 04	97,2
7. Clon R5	86,2

De acuerdo con estos resultados, los somaclones provenientes de CC85-92 pueden considerarse de madurez temprana, es decir, están listos para el inicio de zafra, a los 12 meses de edad. Por el contrario, los somaclones de Ragnar pueden considerarse de madurez media o tardía, pues puede apreciarse que a los 12 meses aún deben completar su ciclo de maduración. Debe señalarse que todos los somaclones de ambas variedades mantienen el carácter de madurez heredado del genotipo donante.

Tabla VII. Medias de los caracteres evaluados en lotes replicados 1 y 2. (Evaluación Julio/2012)

Genotipos	Brix (%)	DTA (cm)	LTA (m)
1. Clon 08	19.45	2.65	<u>3.76</u>
2. Clon 01	18.35	2.52	2.95
3. Clon 02	19.06	2.78	3.21
4. <u>*Clon 03</u>	<u>19.54</u>	2.72	2.85
5. Clon 04	<u>19.19</u>	2.89	2.95
6. Clon 05	<u>20.8</u>	2.75	3.26
7. Clon 07	19.14	2.8	2.85
8. CC85-92	18.8	2.96	3.04
9. Ragnar	18.89	2.76	2.75

*Nueva variedad Clon 03

3.3.3 Producción Agrícola

Los resultados de cosecha de los clones en los lotes replicados, los cuales fueron evaluados durante 3 años consecutivos, aportaron valores muy significativos para la selección de la nueva variedad. Es así que en producción en toneladas de caña por hectáreas (TCH) los clones 03, 04 y 05 obtenidos de la variedad CC 85-92 muestran una mayor producción que el resto de clones y su testigo. Destacándose entre estos el clon 05 en los dos lotes replicados donde fueron evaluados. (Gráficos 5 y 6)

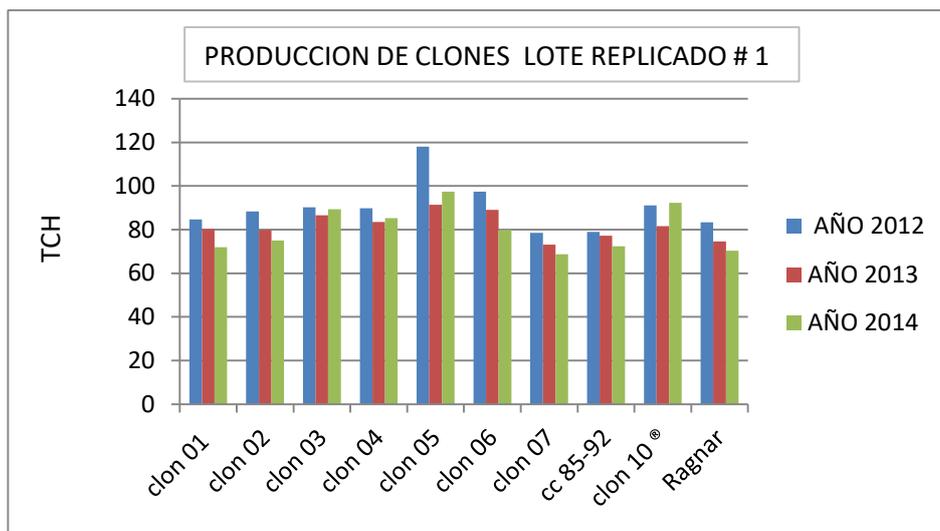


Grafico 5. Producción de clones de caña de azúcar (TCH) evaluadas durante 3 años de cosecha, lote replicado # 1. UNCE, 2014

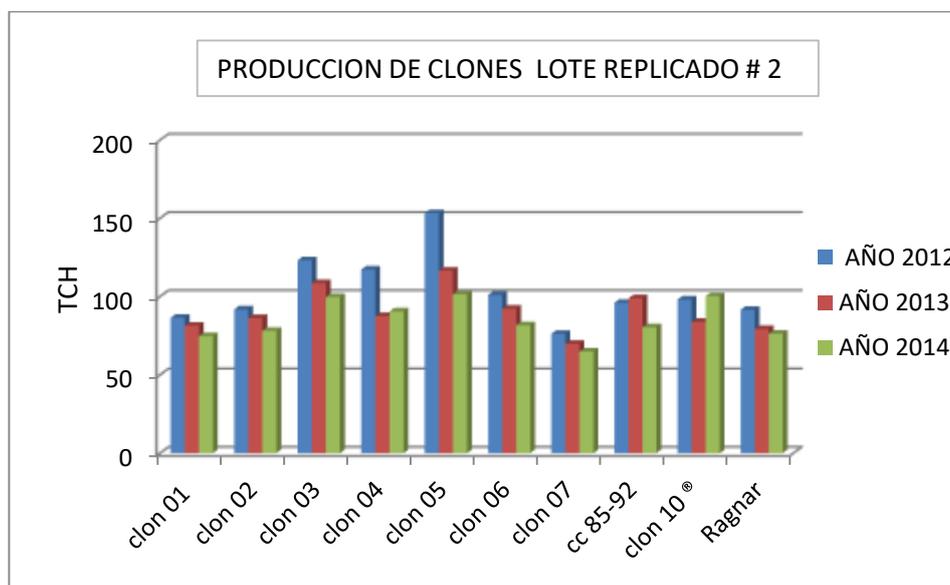


Grafico 6. Producción de clones de caña de azúcar (TCH) evaluados durante 3 años de cosecha, lote replicado # 2 UNCE, 2014

En último trimestre del 2014 se pudo determinar la nueva variedad, la cual había mostrado un buen desempeño tanto en la producción agrícola como azucarera (Figura 4), la cual fue evaluada durante estos 3 últimos años de forma consecutiva, donde se evaluó: caña planta, primera soca y segunda soca.



Figura 4. Lote replicado # 1 en estudio para la selección de clones con mejores caracteres. UNCE, 2012

3.4. Caracterización bioquímica y molecular

3.4.1. Métodos Bioquímicos

3.4.1.1. Análisis mediante (Isoenzimas Peroxidasas)

Los análisis bioquímicos a través de la extracción de la savia de la hoja para caracterizar los somaclones en estudio demuestran que no se encontraron diferencias entre la variedad donante y los clones.

En los análisis de electroforesis realizados se pueden observar que todos los somaclones tienen el mismo número y posición de bandas que la variedad donante CC 85-92 como se observa en la (Figura 5).

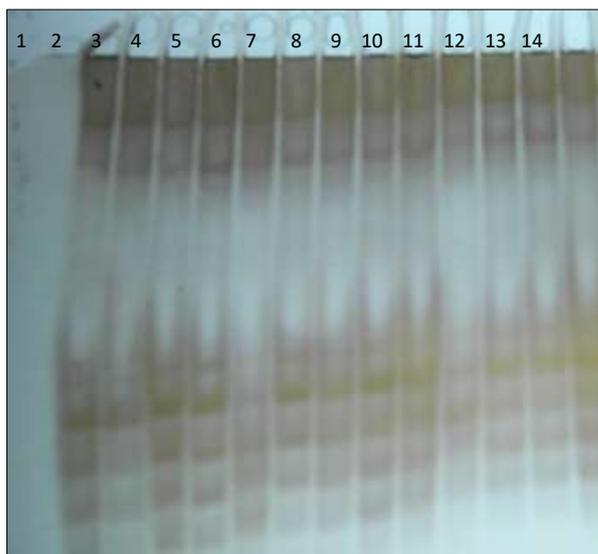


Figura 5.-Electroforesis de isoenzimas peroxidadas de variedad donante y somaclones en estudio de caña de azúcar : 1) vacía; 2); Clon 01 3) clon 02; 4) clon 03; 5) Clon 04; 6) Clon 05; 7) Clon 06 8) Clon 07; 9)Clon 08; 10) Clon 09; 11)CC85-92.UNCE, 2014.

3.4.2. Métodos Moleculares

3.4.2.1. Análisis mediante PCR

Los métodos moleculares basados en el empleo de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permitieron realizar la diferenciación entre estos nuevos individuos y sus cultivares donantes confirmando, desde el punto de vista genético, la existencia de estas nuevas variantes somaclonales de caña de azúcar, que presentan patrones de amplificación basados en secuencias inversas repetidas (ISSR).

Después de realizar varios análisis con los diferentes cebadores tipo microsatélite (ISSR), fue el oligo 376 que dio diferencia entre la planta donante y uno de los clones seleccionados permitiendo realizar la caracterización de estos genotipos.

En la Figura 6, se puede observar que en el clon 03 falta la segunda banda, la cual está presente en el testigo, y en el clon 05.

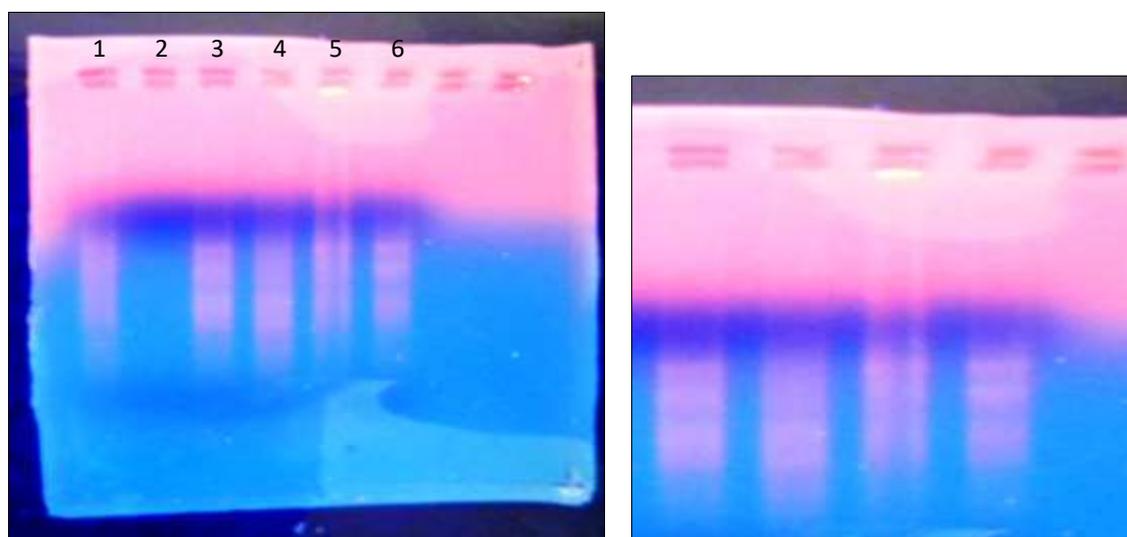


Figura 6. Patrones de amplificación de ADN basados en la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) Electroforesis sobre gel de agarosa 2%. Se emplearon cebadores tipo microsatélites. Carriles 1: Blanco; 3: CC85-92; 4: clon 04; 5: clon 03; 6: clon 05. UNCE, 2015.

3.5. Análisis de la producción en función del tiempo y las variables climáticas.

3.5.1. Análisis de la variación de la producción de caña de azúcar de 20 productores de caña de azúcar entre los años 2008 y 2014.

Se analizaron los datos de producción de 20 productores de caña de azúcar (A – T), los mismos que fueron evaluados durante 7 años (2008 – 2014). Se utilizó un diseño factorial de medidas repetidas, siendo la producción la variable de respuesta. El análisis de los datos ha sido realizado utilizando el software libre R.

Para el efecto se verificó la homogeneidad de la varianza (co-requisito 1 de 2 para realizar un ANOVA o prueba paramétrica) en el que se establecieron las dos hipótesis posibles:

H₀: Existe homogeneidad entre las varianzas

H_A: No existe homogeneidad entre las varianzas

El resultado obtenido fue un valor $p = 0.09092$, el cual es > 0.05 . En este caso, se acepta la hipótesis nula, lo que indica que existe homogeneidad entre las varianzas y por tanto se cumple con uno de los co-requisitos para realizar una prueba paramétrica.

Luego de esto, se realizó el test de normalidad de residuos (co-requisito 2 de 2 para realizar un ANOVA o prueba paramétrica). Se establecieron las respectivas hipótesis:

H₀: Los residuos tienen una distribución normal

H_A: Los residuos no tienen una distribución normal

El valor p obtenido fue de 0.1548, es decir que es > 0.05 , y por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa, lo que indica que la distribución de los residuos si es normal. Por lo tanto se cumplen los dos co-requisitos para realizar una comparación de medias mediante una prueba paramétrica como el ANOVA.

El siguiente paso fue aplicar un Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de respuesta Producción (Toneladas de caña de azúcar por hectárea), utilizando un arreglo para medidas repetidas. Para el efecto se establecieron las siguientes hipótesis:

H0: No existen diferencias significativas o cambios significativos en los promedios de la variable de producción de caña de azúcar a través de los diferentes periodos climáticos (años).

H1: Existen diferencias significativas o cambios significativos en los promedios de la variable de producción de caña de azúcar a través de los diferentes periodos climáticos (años).

El software R arrojó como resultado un valor de $p = 3.19 \times 10^{-5}$, el cual es < 0.05 , y por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa (H1).

Finalmente, para determinar en qué años se da la diferencia significativa de rendimiento se procede a realizar una prueba post hoc en la que se obtuvo como resultado que los rendimientos entre los años 2011, 2012 y 2013 difieren significativamente. (Apéndice D).

3.5.2. Análisis de la correlación entre la variación climatológica de la zona y los rendimientos promedios de caña de azúcar de los productores evaluados.

Se analizan los datos promedio por año de producción de 20 productores de caña de azúcar y datos meteorológicos obtenidos del INHAMI entre el año 2008 y 2012 de la estación meteorológica INGENIO AZTRA ubicada dentro del área geográfica de producción.

Dado que la serie de datos es únicamente de 5 años, se realizan modelos de regresión lineal por cada una de las variables, ya que la literatura recomienda que el número de observaciones supere el número de parámetros a evaluar.

Las variables evaluadas son:

- Año: Años evaluados
Rendimiento promedio/ hectárea/ año de los 20 productores evaluados.
- Prom: evaluados.
- TASma: Temperatura del aire a la sombra (°C) - media anual
- Hrma: Humedad Relativa mensual (%) - media anual

- PR_{ma}: Punto de Roció (°C) - media anual
- TV_{ma}: Tensión de vapor (hPa) - media anual
- P_{sa}: Precipitación (mm) - suma anual
- E_{sa}: Evaporación (mm) - suma anual

Temperatura del aire a la sombra (°C) - media anual (TAS_{ma})

La hipótesis que se consideró fue la siguiente:

H₀: (TAS_{ma} no tiene efecto en Prom)

H₁: (TAS_{ma} si tiene efecto en Prom)

De acuerdo con el R-cuadrado ajustado obtenido, nos indica que la variable TAS_{ma} explica el 39% de la respuesta de rendimiento/Ha de la caña de azúcar. El valor T es menor a 1.91 (< 2) y el valor p = 0.15 es > 0.05 indican que el modelo no tiene un valor predictivo significativo por lo que se acepta H₀, lo que indica que la importancia de la humedad no es significativa.

De este modelo se ha determinado que el intercepto es (-231.51) y el coeficiente para rendimiento promedio anual es 12.04. Por lo tanto, la ecuación completa de la regresión es $Prom = -231.51 + 12.04 * TAS_{ma}$. Esta ecuación aunque no es significativa ($p > 0,05$), predice que el rendimiento promedio de caña de azúcar incrementará 12.04 toneladas por unidad de incremento en el TAS_{ma}.

Estos datos corroboran que la caña de azúcar, al ser una planta denominada fisiológicamente como C4, requiere grandes cantidades de radiación solar, asociada con altas temperaturas para lograr importantes incrementos de producción.

Humedad Relativa mensual (%) - media anual (Hrma).

Para esta variable se concluye que el R-cuadrado ajustado indica que la variable Hrma explica el 57% de la respuesta de rendimiento/Ha de la caña de azúcar. El valor T es menor a -2.512 (< 2) y el valor $p = 0.0868$ es > 0.05 indican que el modelo no tiene un valor predictivo significativo y se acepta H_0 , lo que indica que la relación entre ambas variables no es significativa, a pesar de tener una correlación negativa.

De estos datos se ha determinado que el intercepto es (174.65) y el coeficiente para rendimiento promedio anual es -1.20. Por lo tanto, la ecuación completa de la regresión es $Prom = 174.65 - 1.2 * Hrma$. Esta ecuación aunque no significativa ($p > 0,05$), predice que el rendimiento promedio de caña de azúcar disminuirá 1.2 toneladas por unidad de incremento en el Hrma.

Punto de Rocío (°C) - media anual (PRma)

De acuerdo con el valor de R-cuadrado ajustado, nos indica que la variable PRma explica solo el 2% de la respuesta de rendimiento/Ha de la caña de azúcar. El valor T es menor a -1.043 (< 2) y el valor $p = 0.374$ es > 0.05 indican que el modelo no tiene

un valor predictivo significativo por lo que se acepta H_0 , por lo que sus resultados deben ser utilizados con discreción.

De esta información se ha determinado que el intercepto es (155.728) y el coeficiente para rendimiento promedio anual es -3.690. Por lo tanto, la ecuación de la regresión es $Prom = 155.728 - 3.690 \cdot PR_{ma}$. Esta ecuación aunque no es significativa ($p > 0,05$), predice que el rendimiento promedio de caña de azúcar disminuirá 3.69 toneladas por unidad de incremento en el PR_{ma} .

Tensión de vapor (hPa) - media anual (TV_{ma})

El resultado del valor de R-cuadrado ajustado, nos indica que la variable TV_{ma} explica solo el 6.8% de la respuesta de rendimiento/Ha de la caña de azúcar. El valor T es menor a -1.137 (< 2) y el valor $p = 0.3382$ es > 0.05 indica que el modelo no tiene un valor predictivo significativo por lo que se acepta H_0 .

De esta información se ha determinado que el intercepto es (132.697) y el coeficiente para rendimiento promedio anual es -2.189. Por lo tanto, la ecuación de la regresión es $Prom = 132.697 - 2.189 \cdot TV_{ma}$. Esta ecuación aunque no es significativa ($p > 0,05$), predice que el rendimiento promedio de caña de azúcar disminuirá 2.189 toneladas por unidad de incremento en la TV_{ma} .

Precipitación (mm) – suma anual (Psa)

El valor de R-cuadrado ajustado, nos indica que la variable Psa explica el 32% de la respuesta de rendimiento/Ha de la caña de azúcar. El valor T es menor a 0.097 (< 2) y el valor $p = 0.9288$ es > 0.05 indican que el modelo no tiene un valor predictivo significativo por lo que se acepta H_0 .

De esta información se ha determinado que el intercepto es (74.722) y el coeficiente para rendimiento promedio anual es 5.792×10^{-4} . Por lo tanto, la ecuación de la regresión es $Prom = 74.722 - 5.792 \times 10^{-4} \cdot Psa$. Esta ecuación aunque no es significativa ($p > 0,05$), predice que el rendimiento promedio de caña de azúcar disminuirá en 5.792×10^{-4} toneladas por unidad de incremento en el Psa.

Evaporación (mm) – suma anual (Esa)

El valor de R-cuadrado ajustado, nos indica que la variable Esa explica el 14% de la respuesta de rendimiento/Ha de la caña de azúcar. El valor T es menor a 1.03 (< 2) y el valor $p = 0.283$ es > 0.05 indican que el modelo no tiene un valor predictivo significativo por lo que se acepta H_0 .

Los resultados han determinado que el intercepto es (32.867) y el coeficiente para rendimiento promedio anual es 4.250×10^{-2} . Por lo tanto, la ecuación de la regresión es $Prom = 32.867 - 0,04250 \cdot Esa$. Esta ecuación aunque no es significativa ($p > 0,05$),

predice que el rendimiento promedio de caña de azúcar incrementara 0,0425 toneladas por unidad de incremento en la Esa.

Regresión múltiple que explica la producción en función de todas las variables

El uso de la regresión múltiple permite ver cómo influyen al mismo tiempo las variables más significativas ingresadas al mismo tiempo sobre la producción, el resultado dio la siguiente ecuación múltiple:

$$\text{Prom} = -310 + 1,07(\text{TASma}) + 0,44(\text{PRma}) - 0,21(\text{TVma}) - 0,31(\text{Hrma}).$$

Donde, la ecuación explica el 100% de los puntos, sin embargo no fue significativa debido a los pocos valores que se tenían, a pesar de esto corroboró las tendencias e importancia de las variables ambientales sometidas anteriormente de manera individual. Estas tendencias se asemejan a lo que ocurre en la producción de caña de azúcar, aunque no salió estadísticamente significativa por el poco número de datos para los cinco años.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y DISCUSIONES

Se desarrolló un método de micropropagación in vitro a partir de primordios foliares del verticilo apical, que permitieron obtener un total de 15.000 somaclones, obtenidos a partir de callos embriogénicos en presencia de la auxina 2,4-D. El método desarrollado por Burbano (2009), mediante la obtención de callos embriogénicos en presencia de la auxina 2,4-D, permitió obtener plantas libres de virus en especímenes de caña de azúcar.

La caracterización de los somaclones mediante métodos bioquímicos realizados en este estudio (Isoenzimas Peroxidasas) mediante gel de poliacrilamida, no mostró diferencias en las bandas entre la variedad donante y los clones; sin embargo esto difiere con trabajos realizados por Norberto et al. (2013), donde se observan polimorfismos de bandas diferentes, con y sin la presencia del mutagénico. La probabilidad de que existan estas diferencias se debe a las diferentes concentraciones del 2-4D en la regeneración de callos.

Los análisis moleculares basados en las técnicas de PCR empleando cebadores ISSR, permitieron caracterizar los somaclones en estudio en caña de azúcar; demostrando la variabilidad genética entre el clon 03 y la variedad donante CC 85-92. Los patrones de amplificación de ADN basados en PCR muestran que en el clon 03 falta la segunda banda presente en el testigo y en los clones 04 y 05. Trabajos similares realizados con técnicas para caracterización molecular y diversidad genética (Chia, 2009) al utilizar marcadores moleculares ISSR en la caracterización de 50 genotipos de *Theobroma cacao* se logró encontrar diversidad molecular (fueron seleccionadas 73 bandas amplificadas de las cuales 66 fueron polimórficas con los 5 iniciadores ISSR utilizados) en la colección estudiada.

En el presente estudio los clones 03 y 05 son los que mostraron mejor producción en la cosecha (TCH) en los años evaluados 2012, 2013, 2014. Determinándose al clon 03 como la nueva variedad, cuya media de producción durante los tres años evaluados fue de 93.58 TCH. A diferencia de la producción con la planta donante cuya media fue de 77.3 TCH. Esto es muy prometedora pues la media de producción en la costa ecuatoriana es de 83.2 TCH. CINCAE, (2012).

El clon 03 soportó días de encharcamiento, pues al sembrar los somaclones y su testigo en terrenos donde no había un buen drenaje, éste soportó 8 días consecutivos con agua, con una sobrevivencia de un 75%. Lo que permite predecir que podría soportar periodos de inundaciones a los que la planta normalmente suele tolerar de 2 a 3 días.

La incidencia de las variables climatológicas en la producción de caña de azúcar en los años evaluados marcó una mayor influencia en la producción por parte de la TASma (Temperatura del aire a la sombra media anual), cuya ecuación de regresión aunque no significativa, predice que el rendimiento promedio de la caña de azúcar se incrementará en un 12.04 Ton/ unidad de incremento en la TASma.

RECOMENDACIONES

1. Luego del análisis de los resultados de las bandas microsatélites observadas de los clones 04 y 05 los cuales no difieren de la variedad donante CC 85-92 a pesar de los incrementos en la producción mostrados en los clones promisorios.

Esto se debe a que los genes responsables de los incrementos de la producción constituyen la denominada herencia poligénica lo que significa que más de un gen es responsable del incremento de la productividad.

Esto significa que se deben utilizar otros marcadores moleculares para evidenciar las diferencias genéticas entre un genoma y otro.

2. Continuar evaluando la producción en TCH de los “lotes replicados” para evaluar si se mantienen las altas producciones en el futuro.
3. Seguir evaluando las producciones con las variables ambientales, a fin de afinar las predicciones a través del tiempo.

APÉNDICES

APÉNDICE A

EXPORTACIONES DE AZÚCAR EN EL ECUADOR

<u>Detalle</u>	<u>Toneladas Métricas</u>	<u>FOB USD</u>	<u>Año</u>
Azúcar Crudo	7289,12	2.531.860	2008
Azúcar Blanco	27149,85	10.521.210	
TOTAL ANUAL	34438,97	13'053.070	
Azúcar Crudo	7167,62	3.059.980	2009
Azúcar Blanco	26,13	26.800	
TOTAL ANUAL	7193,75	3'086.780	
Azúcar Crudo	11.152,83	7.775.310	2010
Azúcar Blanco	7.040,64	4.948.560	
TOTAL ANUAL	18.193,47	12'723.870	
Azúcar Crudo	12.191,76	9.244.370	2011
Azúcar Blanco	6.132,55	4.683.090	
TOTAL ANUAL	18.324,31	13'927.460	
Azúcar Crudo	6.775,92	6.706.440	2012
Azúcar Blanco	41,27	57.850	
TOTAL ANUAL	6.817,19	6'764.290	

Fuente: BCE

Elaboración: Autora

APÉNDICE B

Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para micropropagación de caña de azúcar.

COMPONENTE	Dosis/litro de medio de cultivo		
	ESTABLECIMIENTO	MULTIPLICACIÓN	ENRAIZAMIENTO
* Sales de Murashige & Skoog (g) y vitaminas.			
Reguladores:			
AG (mg)	0.1	-	-
BAP (mg)	-	0.2	-
AIA (mg)	1.5	1.5	2.00
KIN (mg)	0.1	0.1	0.1
Otros componentes			
Agua de coco (ml)	100	100	-
Sacarosa (g)	20	20	40
Ph	5.7	5.8	5.7

* Sales de Murashige & Skoog + vitaminas, modificado por S. Korneva. UNCE, 2002.

APÉNDICE C

COMPONENTES DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR.

COMPONENTES	Cultivo de callos Inducción del callo	Regeneración de plantas a partir de callos
Arginina (mg.l ⁻¹)	50	50
AIA (mg.l ⁻¹)	2.0	2.0
2.4 – D (mg.l ⁻¹)	3	-
Agua de coco (ml.l ⁻¹)	100	100
Tiamina (ml.l ⁻¹)		
Agar (g.l ⁻¹)	1.5	1.5
Sacarosa (g)	20	20
pH	5.9	5.9

* Sales de Murashige & Skoog + vitaminas, modificado por S.Korneva. UNCE, 2002.

APENDICE D

Pasos para realizar el análisis estadístico de datos de producción.

a) **Paso 1:** Ingresar base de datos en R

```
>tesis=read.table("C:/Users/John/Desktop/ANA tesis/proceso 1.txt",
header=TRUE)
```

```
>tesis
```

	Año	Productor	Producción				
				85	2012	E	111.99
1	2008	A	110.00	86	2012	F	102.89
2	2008	B	80.75	57	2010	Q	69.08
3	2008	C	84.01	58	2010	R	75.67
4	2008	D	98.72	59	2010	S	53.99
5	2008	E	72.82	60	2010	T	56.05
6	2008	F	60.29	61	2011	A	113.72
7	2008	G	66.88	62	2011	B	103.82
8	2008	H	54.95	63	2011	C	56.40
9	2008	I	69.88	64	2011	D	64.74
10	2008	J	51.33	65	2011	E	114.52
11	2008	K	58.20	66	2011	F	100.69
12	2008	L	54.35	67	2011	G	103.07
13	2008	M	72.59	68	2011	H	42.90
14	2008	N	68.79	69	2011	I	65.88
15	2008	O	70.50	70	2011	J	91.19
16	2008	P	54.74	71	2011	K	72.97
17	2008	Q	76.27	72	2011	L	81.13
18	2008	R	76.35	73	2011	M	87.68
19	2008	S	51.02	74	2011	N	74.21
20	2008	T	65.04	75	2011	O	75.70
21	2009	A	89.36	95	2012	O	88.67

22	2009	B	42.60	96	2012	P	89.94
23	2009	C	72.97	97	2012	Q	74.80
24	2009	D	82.03	98	2012	R	68.15
25	2009	E	73.35	99	2012	S	58.27
26	2009	F	57.92	100	2012	T	68.30
27	2009	G	54.86	101	2013	A	78.20
28	2009	H	52.30	102	2013	B	64.07
29	2009	I	60.80	103	2013	C	55.40
30	2009	J	83.06	104	2013	D	57.85
31	2009	K	67.41	105	2013	E	60.57
32	2009	L	69.12	106	2013	F	70.70
33	2009	M	74.69	107	2013	G	64.21
34	2009	N	86.43	108	2013	H	50.16
35	2009	O	85.90	109	2013	I	61.23
36	2009	P	56.43	110	2013	J	54.44
37	2009	Q	75.50	111	2013	K	58.26
38	2009	R	80.59	112	2013	L	58.55
39	2009	S	57.70	113	2013	M	43.64
40	2009	T	57.07	114	2013	N	54.74
41	2010	A	107.40	115	2013	O	79.50
42	2010	B	87.39	116	2013	P	57.11
43	2010	C	98.22	117	2013	Q	76.30
44	2010	D	52.18	118	2013	R	48.66
45	2010	E	91.21	119	2013	S	44.71
46	2010	F	49.29	120	2013	T	51.73
47	2010	G	42.82	121	2014	A	121.62
48	2010	H	76.26	122	2014	B	71.73
49	2010	I	75.59	123	2014	C	75.23

50	2010	J	51.82	124	2014	D	57.37
51	2010	K	70.45	125	2014	E	102.23
52	2010	L	64.71	126	2014	F	70.26
53	2010	M	83.15	127	2014	G	74.56
54	2010	N	56.93	128	2014	H	79.75
55	2010	O	70.60	129	2014	I	74.31
56	2010	P	54.41	130	2014	J	63.69
76	2011	P	63.12	131	2014	K	49.38
77	2011	Q	69.38	132	2014	L	73.60
78	2011	R	85.24	133	2014	M	59.23
79	2011	S	47.21	134	2014	N	75.91
80	2011	T	63.91	135	2014	O	84.60
81	2012	A	116.41	136	2014	P	52.20
82	2012	B	55.45	137	2014	Q	94.00
83	2012	C	97.07	138	2014	R	84.55
84	2012	D	62.30	139	2014	S	47.25
				140	2014	T	63.32

b) **Paso 2:** Verificar tipo de variables

```
>attach(tesis)
The following object is masked _by_ .GlobalEnv:
Producción

>str(tesis)
'data.frame': 140 obs. of 3 variables:
 $ Año      : int  2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 ...
 $ Productor : Factor w/ 20 levels "A","B","C","D",...: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ...
 $ Producción: num 110 80.8 84 98.7 72.8 ...
```

c) **Paso 3:** Transformar variables en factores

```
>ñoF<-factor(tesis$Año)
>ñoF
 [1] 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008 2008
2008 2008 2008
 [18] 2008 2008 2008 2009 2009 2009 2009 2009 2009 2009 2009 2009 2009 2009
2009 2009 2009
 [35] 2009 2009 2009 2009 2009 2009 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010
2010 2010 2010
 [52] 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2010 2011 2011 2011 2011 2011
2011 2011 2011
 [69] 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2011 2012
2012 2012 2012
 [86] 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012 2012
2012 2013 2013
 [103] 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013 2013
2013 2013 2013
 [120] 2013 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014 2014
2014 2014 2014
 [137] 2014 2014 2014 2014
Levels: 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014
>
>ProductorF<-factor (tesis Productor)
>ProductorF
 [1] A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T A B C D E F G H I J K L M N O
P Q R S T A B C
 [44] D E F G H I J K L M N O P Q R S T A B C D E F G H I J K L M N O P Q R
S T A B C D E F
 [87] G H I J K L M N O P Q R S T A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T A
B C D E F G H I
 [130] J K L M N O P Q R S T
Levels: A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
```

- d) **Paso 4:** Verificar homogeneidad de la varianza (co-requisito 1 de 2 para realizar un ANOVA o prueba paramétrica)

H_0 : Existe homogeneidad entre las varianzas

H_A : No existe homogeneidad entre las varianzas

```
>library (car)
>leveneTest(Produccion~AñoF, data=tesis, center=mean)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
```

```
Df F value Pr(>F)
group 6 1.8677 0.09092 .
      133
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

- e) **Paso 5:** Realizar test de normalidad de residuos (co-requisito 2 de 2 para realizar un ANOVA o prueba paramétrica)

H_0 : Los residuos tienen una distribución normal

H_A : Los residuos no tienen una distribución normal

```
>ovP<-aov(Produccion~AñoF, data=tesis)
>summary(aovP)
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
AñoF      6    5689    948.2  3.481 0.00315 **
Residuals 133   36224    272.4
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>library(nortest)
>lillie.test(aovP$res)

      Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data:  aovP$res
D = 0.0651, p-value= 0.1548
```

- f) **Paso 6:** Se aplica ANOVA para la variable de respuesta **Producción** (rendimiento de la planta de caña de azúcar por hectárea), utilizando un arreglo para medidas repetidas.

H_0 : No existen diferencias significativas o cambios significativos en los promedios de la variable de producción de caña de azúcar a través de los diferentes periodos climáticos (años).

H1: Existen diferencias significativas o cambios significativos en los promedios de la variable de producción de caña de azúcar a través de los diferentes periodos climáticos (años).

```
>ov.out=aov(Produccion~AñoF+Error(ProductorF/AñoF), data=tesis)
>summary(aov.out)
```

Error: ProductorF

Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Residuals	19	17299	910.5	

Error: ProductorF:AñoF

Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
AñoF	6	5689	948.2	5.712 3.19e-05 ***
Residuals	114	18925	166.0	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- g) **Paso 7:** Para determinar en qué años se da la diferencia significado de rendimiento se procede a realizar una prueba post hoc

```
>with(tesis, pairwise.t.test(Produccion, AñoF, p.adjust.methos="holm",
paired=T))
```

Pairwise comparisons using paired t tests

Data: Produccion and AñoF

	2008	2009	2010	2011	2012	2013
2009	1.0000	-	-	-	-	-
2010	1.0000	1.0000	-	-	-	-
2011	0.8303	0.8113	0.9138	-	-	-
2012	0.4628	0.3313	0.4628	1.0000	-	-
2013	0.0951	0.1883	0.4628	0.00400.0002	-	-
2014	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9138	0.0064

P value adjustment method: holm

BIBLIOGRAFIA

1. ACSA, (Asociación de Cañicultores Sector Aztra) 2013. Astolfo Pincay Flores, informe de presidencia.
2. Arellano AC., Ramos- Leal M, Loor Z., Cabanilla L., Korneva S., Pincay Flores A., 2012. Identificación de cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) mediante el empleo de isoenzimas peroxidadas. Rev. CNIC/Ciencias Biológicas 43(3):
3. BID (Banco Interamericano de Desarrollo), 2012. El Cambio Climático y la Producción Agrícola
4. Burbano, Carlos., 2009. Manejo del virus de la hoja amarilla (*Sugarcane Yellow Leaf Virus*, SCYLV) de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) mediante cultivo de tejidos y el uso de agentes inductores de Resistencia Sistémica Adquirida, SAR". Tesis de maestría, ESPOL, Guayaquil, Ecuador.
5. Casal, I., García, L., Guisan, G., y Martínez, M., 2000. La Biotecnología aplicada a la agricultura. Eumedia p. 49

6. CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe), 1999. Efectos macroeconómicos del fenómeno El Niño de 1997- 1998. Su impacto en las economías Andinas.

7. CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe), 2008. Tableros de comando para la promoción de biocombustibles en el Ecuador informe de la ONU a la CEPAL: 75-100. Disponible en:
<http://www.cepal.org/cgibin/getProd.asp?xml=/publicaciones/xml/9/33219/P33219.xml&base=/drni/tpl/top-bottom.xsl>

8. CINCAE (Centro de Investigaciones de la caña de azúcar en el Ecuador), 2012. Producción de la caña de azúcar en la costa ecuatoriana. Informe anual.

9. Chia, J., 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS – Tingo María. Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Disponible en:
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/244/1/Chia_wj.pdf

10. Dellaporta SL, Woods J and JB Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: versión II. *PlantMolec. Biol. Rep* 1:19-21

11.FAO, (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación), 2014. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030.

Disponible en:

<http://www.fao.org/docrep/004/y35575>

Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030

12.Garcés F., Silva E, Aime C, Gong Y, Glynn N, Castlebury L, Comstock J, Fiallos F, León T, Martínez F., 2011. Presencia de la roya naranja de la caña de azúcar (*Puccinia kuehnii* Butler) en Ecuador. Carta informativa CINCAE 13 (2):7-12

13.Gómez, F., Trejo, L. y Sentíes, H., 2014. Innovaciones biotecnológicas en caña de azúcar para potenciar su uso como biofábrica. ATAM, 27(1): 33-41

14. Iglesias L., H. Lima and JP Simon., 1974. Isozyme identification of cigotic and nucellar seedling in *Citrus*. J. Hered. 65: 81- 84

15.INAMHI, 2012. (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). Anuario Meteorológico, años 2008 al 2012. Disponible en:

www.serviciometeorologico.gob.ec

16. INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos), 2011. Boletín agropecuario mensual, N° 10. Disponible en:
www.ecuadorencifras.gob.ec

17. INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos), 2012. Disponible en:
www.inec.gob.ec

18. Larkin P. J. and Scowcroft W., 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197 - 214

19. Livitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp E, y Mroginski, L. 2010. *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*. INTA. p. 16

20. Mendoza J., Gualle D., Gómez P., Ayora A., Martínez I., y Cabezas C., 2011. *Progresos en el manejo de plagas en la caña de azúcar en el Ecuador*.
Disponible en:
http://www.aeta.org.ec/2do%20congreso%20cana/art_campo/MENDOZA%20cana.pdf

21. Monteiro L., Sentelhas P., 2014. Potential and Actual Sugarcane Yields in Southern Brazil as a Function of Climate Conditions and Crop Management

22. Murashige H. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 443-497
23. Norberto, C., León, C., Ilich S., Mercado, D., 2013. Identificación de polimorfismo de peroxidasas en callos de *Saccharum officinarum* obtenidas por organogenesis somática empleando el 2, 4- diclorofenoxiacético. *Arnaldoa* 20(2): 457 - 468
24. Pérez G., Bernal N., China A., O'Really J., Prada F., 1997. Recursos genéticos de la caña de azúcar. *Publicaciones Imago. Cuba* 91-106
25. Pérez Ponce J., Alvarado, Y., Gómez, R., Orellana, P. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Volumen 1.
26. Pérez P., 1991. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar In. Roca, W. y Mroginski, L. Eds. *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Colombia.* p. 543 – 575.
27. Rojas, S., García, J., y Alarcón, M., 2004. Propagación asexual de plantas. (pp. 31-37) Bogotá: Promedios
28. UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación la Ciencia y la Cultura), 2008. El planeta en peligro. número 3.