



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN BOTÁNICA

**Propagación *in vitro* de caña de
azúcar (*Saccharum officinarum* L.)
en sustratos**

ANGÉLICA SÁNCHEZ RUIZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

JULIO 2015

La presente tesis titulada: Propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en sustratos, realizada por la alumna: Angélica Sánchez Ruiz bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Carlos Trejo López

DIRECTORA DE TESIS



Dra. Alejandrina Robledo Paz

ASESOR



Dr. Víctor Manuel Ordaz Chaparro

ASESOR



Dr. José Luis Cabrera Ponce

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS) por brindarme los espacios necesarios para el desarrollo de esta investigación.

Al Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que financió mis estudios de maestría.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz, por compartir sus conocimientos, anécdotas y experiencias de manera personal y profesional. Gracias por su comprensión, tiempo y paciencia durante todo este proceso.

Al Dr. Carlos Trejo, por la sonrisa, amabilidad y disponibilidad que me brindo siempre que acudí a usted, así como el apoyo y confianza que deposito en mí.

Al Dr. Víctor M. Ordaz Chaparro, por las facilidades y el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio de física de suelos. Y por compartir sus conocimientos y experiencias en el salón de clase.

Al Dr. José Luis Cabrera Ponce, por las observaciones realizadas a este trabajo.

A la Sra. Silvia Antero por su apoyo incondicional en las largas jornadas de trabajo, por su preocupación, atención y cariño, gracias.

A los amigos (as) y compañeros (as) que me apoyaron de alguno u otro modo y que llegaron a mi vida a hacerla más divertida y amena. iiiiiMuchas gracias!!!! a Josefina, Giovana, Araceli, Aranzazu, Tucuch, Betza, Sandra, Nora, Elizabeth, Mariana, Mirna, David (loco), Miguel Angel, Angel, Luis Antonio, Daniel MA. y Carlos SH.

DEDICATORIAS

A mis padres: J. Jesús Sánchez Loza y Graciela Ruiz González. Por su incondicional apoyo y cariño, porque sin ustedes yo no habría llegado hasta donde estoy ahora. Con todo mi amor, reconocimiento y respecto les dedico este trabajo que es resultado de mi esfuerzo.

A mi hermana: Erendira Sánchez Ruiz. Por estar a mi lado cuando más te necesito, con un abrazo, una palabra de aliento o un regaño. Te quiero mucho y te admiro.

A mi hermano y su familia: David Salomón Sánchez Ruíz, Alma Lizeth Torres Galicia, Damián Sánchez Torres y Abigail Sánchez Torres. Por confiar en mí, apoyarme y alentarme a seguir adelante, en beneficio mío y en el de las generaciones que vienen detrás. Los quiero mucho.

A mi novio: Aarón Mendoza Martínez. Por creer en mí, por apoyar cada una de mis decisiones y locuras, por todo tu amor y porque a pesar de los momentos difíciles no has soltado mi mano. Te amo.

A mi amiga: Ma. Josefina Jimarez Montiel. Por tu comprensión, cariño, consejos y apoyo incondicional, el compartir una etapa más en nuestras vidas fue invaluable para mí, muchas gracias "chata" te quiero mucho.

A mi amigo: Cesar Jacier Tucuch Haas. Porque contar con tu amistad es de las mejores cosas que me pasaron en la maestría, gracias por tu incondicional apoyo y consejos.

A mi amiga Aranzazu Barrena Alba: Por brindarme tu amistad y por mostrarme que a veces no debo tomar la vida tan en serio, las cosas en ocasiones son más sencillas de lo que parecen.

PROPAGACIÓN *in vitro* DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) EN SUSTRATOS

**Angélica Sánchez Ruiz, MC
Colegio de Postgraduados, 2015**

La caña de azúcar se propaga principalmente de manera asexual, lo cual causa la pérdida de vigor de los materiales y facilita la diseminación de enfermedades. El cultivo de tejidos es una técnica que permite la producción masiva de plantas más vigorosas, genéticamente puras y libres de patógenos. No obstante, una desventaja de esta técnica es el costo alto de los componentes utilizados, principalmente el agente gelificante (agar). El objetivo de esta investigación fue utilizar sustratos para reducir los costos de producción de vitroplantas de caña de azúcar. Brotes adventicios de las variedades Mex 79-431 y L60-14 regenerados *in vitro* fueron cultivados en medios que contenían las sales basales de Murashige y Skoog y distintas concentraciones y combinaciones de 6-furfurilaminopurina (cinetina), 6-bencilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ) y ácido indolbutírico (AIB), utilizando como soporte agar o la mezcla de sustratos vermiculita-perlita con tamaño de partícula de 0.25 y 0.5 mm. El porcentaje mayor de explantes con brotes (85%) y número de brotes por explantes (2.0) se obtuvo en los medios que contenían 0.1 mg L⁻¹ de cinetina y 2 mg L⁻¹ BAP o 0.5 mg L⁻¹ TDZ gelificados con agar. Combinar la mezcla de vermiculita-perlita (0.25 mm) y un medio sin AIB permitió obtener valores estadísticamente iguales para la mayoría de las variables evaluadas durante la etapa de enraizamiento y aclimatación (porcentaje de enraizamiento, número de raíces laterales, longitud de la raíz principal, supervivencia, número de hojas, longitud y diámetro de tallo), que los registrados para los tratamientos constituidos por AIB y agar como soporte, por lo que es posible sustituir el agar por sustratos durante la etapa de enraizamiento y con ello reducir los costos de producción.

Palabras clave: *Saccharum officinarum*, costos, sustratos, micropropagación, vitroplantas

***In vitro* PROPAGATION OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) IN SUBSTRATES**

**Angélica Sánchez Ruiz, MC
Colegio de Postgraduados, 2015**

Sugar cane is propagated mainly asexually, causing the loss of vigor of the materials and facilitates the dissemination of diseases. Tissue culture is a technique for massive production of plants more vigorous, genetically pure and pathogen-free. However, a disadvantage of this technique is the high cost of the components used, mainly the gelling agent (agar). The objective of this research was to use substrates to reduce the production costs of sugarcane vitroplants. Adventitious buds varieties Mex 79-431 y L60-14 regenerated in vitro were cultured in basal media containing Murashige and Skoog salts and different concentrations and combinations of 6-furfurylaminopurine (kinetin), 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ) and indole butyric acid (IBA), using as a support agar or the mixture of vermiculite-perlite substrates with particle size of 0.25 and 0.5 mm. The highest percentage of explants with shoots (85%) and number of shoots per explant (2.0) was obtained in medium containing 0.1 mg L⁻¹ kinetin and 2 mg L⁻¹ BAP or 0.5 mg L⁻¹ TDZ gelled with agar. Combining the mixture of vermiculite-perlite (0.25 mm) and a medium without AIB allowed to obtain statistically similar values for most variables evaluated during the rooting and acclimatization stage (percentage of rooting, number of lateral roots, taproot length, survival, number of leaves, stem length and diameter), that registered for the treatments constituted by AIB and agar as a support. It is possible to replace the agar for substrates during the rooting stage and thereby reduce costs production.

Keywords: *Saccharum officinarum*, cost, substrates, micropropagation, plantlets

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS PARTICULARES	3
HIPÓTESIS GENERAL	4
HIPÓTESIS PARTICULARES.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Importancia económica.....	5
Clasificación taxonómica	6
Descripción botánica	6
Origen y producción	7
Aspectos agronómicos	8
Temperatura y humedad	8
Tipo de suelo.....	9
Variedades cultivadas	9
Híbrido L60-14.....	10
Híbrido Mex 79-431.....	11
Micropropagación.....	12
Yemas axilares.....	13
Organogénesis <i>de novo</i>	13
Embriogénesis somática.....	14
Medio de cultivo.....	14
Fitohormonas y reguladores de crecimiento.....	15
Auxinas	16
Citocininas.....	16
Thidiazuron	18
Micropropagación en caña de azúcar	19
Sustratos.....	21
Perlita	23
Vermiculita	24
Tezontle.....	24
Micropropagación utilizando sustratos.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Caracterización física de sustratos	28
Determinación de densidad aparente (Da).....	28

Determinación de porosidad.....	29
Determinación del porcentaje de retención de humedad.....	30
Micropropagación.....	31
Experimento 1. Inducción de brotes adventicios.....	31
Material vegetal	31
Medio de inducción de brotes adventicios.....	31
Condiciones de cultivo	32
Diseño experimental.....	32
Experimento 2. Enraizamiento de brotes adventicios	32
Material vegetal	32
Medio de enraizamiento.....	32
Condiciones de cultivo	33
Diseño Experimental.....	33
Aclimatación	33
Diseño Experimental.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Experimento 1. Inducción de brotes.....	35
Supervivencia	35
Efecto de la variedad.....	35
Efecto del sustrato	36
.....	38
Efecto del medio de cultivo	38
.....	39
Efecto de la interacción variedad, sustrato y medio de cultivo (tratamientos)	39
Número de brotes por explante	41
Efecto de la variedad.....	41
Efecto del sustrato	42
Efecto del medio de cultivo	44
Efecto de la interacción entre variedad, medio de cultivo y sustrato (tratamientos)...	48
Explantes que formaron brotes.....	49
Efecto de la variedad.....	49
Efecto del sustrato	50
Efecto del medio de cultivo	52
Efecto de la interacción entre variedad, medio de cultivo y sustrato (Tratamientos) ..	54
Experimento 2. Enraizamiento	55

Supervivencia	55
Efecto de la variedad	55
Efecto del sustrato	56
Efecto del medio de cultivo	57
Porcentaje de enraizamiento	58
Efecto del sustrato	60
Efecto del medio de cultivo	61
Efecto de la interacción variedad, medio de cultivo y sustrato (Tratamientos).....	63
Raíces secundarias	64
Efecto de la variedad	64
Efecto del sustrato	66
Efecto de la interacción variedad, medio de cultivo y sustrato (Tratamientos).....	71
Longitud de la raíz principal	73
Efecto de la variedad	73
Efecto del sustrato	74
Efecto del medio	75
Efecto de la interacción variedad, medio de cultivo y sustratos (Tratamientos).	77
Aclimatación	78
Supervivencia	78
Efecto de los tratamientos	78
Número de hojas.....	81
Efecto de los tratamientos	81
Longitud del tallo	85
Efecto de los tratamientos	85
Diámetro del tallo.....	88
Efecto de los tratamientos	88
CONCLUSIONES.....	95
LITERATURA CITADA	96

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Procesos del desarrollo controlados por la combinación de auxinas y citocininas.....	17
Cuadro 2. Propiedades químicas y físicas de la perlita.....	24
Cuadro 3. Propiedades químicas y físicas de la vermiculita	24
Cuadro 4. Propiedades físicas y químicas del tezontle	25
Cuadro 5. Número de hojas, longitud del tallo y diámetro del tallo de las plantas de caña de azúcar de dos variedades de caña de azúcar	82
Cuadro 6. Costo de un litro de medio de cultivo elaborado con las sales basales de Murashige y Skoog (1962).....	92
Cuadro 7. Costo (en pesos por litro) de medios para la inducción de brotes con agar o sustratos.....	93
Cuadro 8. Costo (en pesos) por litro de los medios de enraizamiento con agar o sustratos.....	93
Cuadro 9. Costo (en pesos) por litro de medio de cultivo en el método convencional y el método propuesto.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiones cañeras de México	8
Figura 2. Micropropagación por yemas.....	13
Figura 3. Estructura química de fithormonas y reguladores de crecimiento.....	18
Figura 4. Estructura química de thidiazuron	19
Figura 5. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la variedad	36
Figura 6. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto del sustrato	38
Figura 7. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo.....	39
Figura 8. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamiento)	40
Figura 9. Número de brotes por explantes por efecto de la variedad.....	42
Figura 10. Número de brotes por explante por efecto del sustrato.....	43
Figura 11. Brotes arrocetados de la variedad Mex 79-431 de caña de azúcar obtenidos en el medio M2 con agar	45
Figura 12. Brotes normales de dos variedades de caña de azúcar obtenidos en el medio M3 y agar. A. L 60-14. B. Mex 79-431.....	47
Figura 13. Número de brotes por explante por efecto del medio de cultivo	47
Figura 14. Número de brotes por explante por efecto de la interacción (tratamientos).....	48
Figura 15. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto de la variedad	50
Figura 16. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto del sustrato...	52

Figura 17. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto del medio de cultivo	53
Figura 18. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto de la interacción (tratamientos).....	54
Figura 19. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la variedad	55
Figura 20. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto del sustrato	56
Figura 21. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo.....	57
Figura 22. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamientos).....	58
Figura 23. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto de la variedad	59
Figura 24. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto del sustrato	61
Figura 25. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo.....	62
Figura 26. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamientos).....	64
Figura 27. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto de la variedad	65
Figura 28. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto del sustrato	66
Figura 29. Comparación entre raíces de plántulas de caña de azúcar crecidas en sustrato y agar.....	68
Figura 30. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo.....	70
Figura 31. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamientos).....	72

Figura 32. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios por efecto de la variedad	73
Figura 33. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios por efecto del sustrato	75
Figura 34. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo	76
Figura 35. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios formados por efecto de la interacción (tratamientos).....	78
Figura 36. Supervivencia de las plantas regeneradas en diferentes tratamientos.....	80
Figura 37. Número de hojas formadas por plantas de dos variedades de caña de azúcar enraizadas <i>in vitro</i> en diferentes tratamientos por efecto de la interacción.....	84
Figura 38. Longitud del tallo de plantas de dos variedades de caña de azúcar enraizadas <i>in vitro</i> en distintos tratamientos por efecto de la interacción	87
Figura 39. Diámetro del tallo de plantas de dos variedades de caña de azúcar enraizadas <i>in vitro</i> en distintos tratamientos por efecto de la interacción	90

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es una gramínea tropical, en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa (azúcar) (Alexander, 1985; Castillo y Silva, 2004). Este cultivo constituye una de las principales fuentes de alimentación y elaboración de productos industriales para el hombre (Rossi, 2001). Tiene un alto valor económico y México ocupa el 7º lugar en producción a nivel mundial (SIAP-SAGARPA, 2015; Enriquez-Poy, 2013).

La industria azucarera posee un gran potencial para ser competitiva y rentable; sin embargo, debe superar retos como la escasa u obsoleta tecnología empleada tanto en campo como en fábrica, el cambio climático y la creciente apertura del mercado a edulcorantes alternativos, para trascender en el ámbito de la producción, transformación y comercialización (Hernández-Cázar, 2014, Senties-Herrera, 2013). Las variedades comerciales de caña de azúcar se propagan principalmente de manera vegetativa (Franklin *et al.*, 2006; SIAP-SAGARPA, 2015). No obstante, las sucesivas multiplicaciones de un mismo individuo (clones), es una práctica agrícola que limita la recombinación genética y causa envejecimiento del material vegetal (pérdida de vigor), mayor susceptibilidad de las plantas a contraer enfermedades (Trippi, 2007). Por tal motivo se hace necesaria la búsqueda de nuevas técnicas que contribuyan a la producción de plantas de manera más eficiente. La biotecnología a través del cultivo de tejidos, permite la producción

masiva de plantas con pureza genética, libres de patógenos y más vigorosas (Aguilar *et al.*, 2011; Castañeda-Castro *et al.*, 2014; FAO, 2014).

No obstante, una desventaja de esta técnica es el alto costo de los componentes utilizados, principalmente el agente gelificante (agar) que se utiliza en los medios de cultivo, el cual llega a representar el 70% del costo de producción (Martin *et al.*, 2012). Asimismo, el agar (gelificante más utilizado) no es inerte fisiológicamente, posee cantidades variables de sustancias inhibidoras o estimulantes del crecimiento (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999) y puede retener agua y sales e inmovilizar algunos iones del medio de cultivo (Sholten, 1998). Cambios en la composición o concentración del agar pueden afectar la regeneración de plantas o tejidos y su desarrollo (Marga *et al.*, 1997).

Una alternativa al uso de agentes gelificantes en los medios de cultivo es la utilización de sustratos, los cuales a diferencia de los gelificantes permiten mayor difusión del oxígeno, mayor movilidad de los nutrientes del medio de cultivo en el recipiente, reducen la producción de etileno y CO₂, evitan la vitrificación y aumentan la producción de clorofila (Afreem-Zobayed *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Martínez-Hernández *et al.*, 2006).

Jay-Allemand *et al.*, 1992 observaron mayor porcentaje de enraizamiento y longitud promedio de raíces primarias de brotes de seis clones (D152, G1, MR8,

MR9, HA3-1, HA2-13) de nogal crecidos en vermiculita que las cultivadas en agar (Driver y Kuniyuki, 1984). Por otro lado, Afreen-Zobayed *et al.* (2000) obtuvieron mayor número de hojas, área foliar, peso fresco y seco de hojas, tallos y raíz en plántulas de papa (*Ipomea batatas*) desarrolladas sobre una mezcla de vermiculita pulpa de papel 7:3 (v/v) y medio MS líquido sin vitaminas ni sacarosa, que las desarrolladas en agar.

Por lo anterior, y aunado a que hasta el momento no se conocen reportes sobre la propagación *in vitro* de caña de azúcar utilizando sustratos, el presente trabajo tuvo como objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de caña de azúcar de bajo costo utilizando sustratos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento cinetina (K), benciladenina (BA) y thidiazuron (TDZ), en la formación *in vitro* de brotes adventicios de las variedades Mex 79-431 y L 60-14 de caña de azúcar.
- Evaluar el efecto de los sustratos (perlita-vermiculita) en la formación *in vitro* de brotes adventicios y raíces de las variedades en estudio.

- Analizar el comportamiento de las plantas regeneradas *in vitro* en sustratos y agar durante la aclimatación.

HIPÓTESIS GENERAL

- La utilización de sustratos permitirá desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de caña de azúcar de bajo costo.

HIPÓTESIS PARTICULARES

- Al menos uno de los reguladores de crecimiento (K, BA y TDZ) inducirá la formación de brotes adventicios en las variedades Mex 79-431 y L 60-14 de caña de azúcar.
- Los sustratos (perlita-vermiculita) permitirán la formación de brotes adventicios y su enraizamiento con la misma eficiencia que el agar.
- Las plantas regeneradas *in vitro* en sustratos tendrán mejor comportamiento durante la aclimatación que las obtenidas en agar.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia económica

La caña de azúcar es también conocida con los nombres de caña de castilla, caña dulce, cañaduz, cañamelar, cañamiel y Sa-Kar (Díaz y Portocarrero, 2002). El tallo de esta planta es el órgano de mayor importancia desde el punto de vista económico debido a la producción de azúcar ya que en él se lleva a cabo la acumulación de sacarosa (Subirós, 2000; Castillo y Silva, 2004). Aunque, es utilizada preferentemente para la elaboración de azúcar, también sirve como materia prima para una amplia gama de derivados, así como la elaboración de biodiesel (Castillo y Silva; Maserá, 2011). Este cultivo se desarrolla en 15 entidades federativas y 227 municipios en México (Gómez-Merino, 2014), siendo el estado de Veracruz el líder productor de azúcar (Hernández-Cázar, 2014).

Asimismo, la agroindustria azucarera genera más de 2.5 millones de empleos (Enríquez-Poy, 2013) entre productores, trabajadores de campo, transportistas, obreros y administrativos (CNIAA, 2011).

Clasificación taxonómica (Arévalo *et al.*, 2006; MEXU, 2014)

REINO: Plantae

PHYLUM: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsida

ORDEN: Cyperales

FAMILIA: Poaceae

GÉNERO: *Saccharum*

EPÍTETO ESPECÍFICO: *officinarum*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Saccharum officinarum*



El género *Saccharum* se divide en seis especies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. robustum*, *S. edule* (Dutt y Rao, 1950).

Descripción botánica

El color de los tallos depende de la variedad, generalmente es verde; sin embargo, pueden apreciarse coloraciones amarillas, rojizas, moradas o combinadas a causa de la presencia de pigmentos como las xantofilas, antocianinas, carotenos y clorofila. El nudo es la parte del tallo donde nace la hoja, y los entrenudos son los espacios comprendidos entre dos nudos (Subirós, 2000).

Las laminas foliares de la caña de azúcar son ligeramente asimétricas y se insertan en cada nudo en un arreglo alterno. La longitud, ancho, grosor y la disposición de las hojas dependen de la variedad (Subirós, 2000).

La inflorescencia es una panícula, la ramificación es mayor en la base y disminuye en la parte superior hasta terminar en un solo eje. Las flores son hermafroditas formadas por un ovario y dos estigmas largos y plumosos. El androceo está formado por tres estambres donde se encuentran las anteras con los granos de polen (Subirós, 2000).

Origen y producción

En 1928 Brandes y Sartoris propusieron a Nueva Guinea como lugar de origen de la caña (Flores, 2001; Arévalo *et al.*, 2006). La caña de azúcar fue introducida al continente americano en 1493 por Cristóbal Colón desde las islas canarias, España; se cultivó por primera vez en la ahora República Dominicana y Haití. De ahí los conquistadores la llevaron a Cuba, Jamaica, Puerto Rico y otras islas del Caribe (Flores, 2001). Los primeros clones fueron traídos a México desde Cuba en 1519 por Hernán Cortés quien los estableció en San Andrés Tuxtla, Veracruz. (García, 1984; García, 1997).

Dentro de los principales productores de caña de azúcar se encuentra Brasil con 30% de la producción, seguido de India y China con un 21 y 7 %, respectivamente (Aguilar-Rivera *et al.*, 2012). En México la industria azucarera se encuentra

distribuida en seis regiones y 15 estados: (1) Región Noroeste (Sinaloa), (2) Región Pacífico (Nayarit, Jalisco, Michoacán y Colima), (3) Región Centro (Morelos y Puebla), (4) Región Noreste (Tamaulipas y San Luis Potosí), (5) Región Golfo (Veracruz, Tabasco y Oaxaca) y (6) Región Sur (Campeche, Chiapas y Quintana Roo) (CNIAA, 2011) (Figura 1).

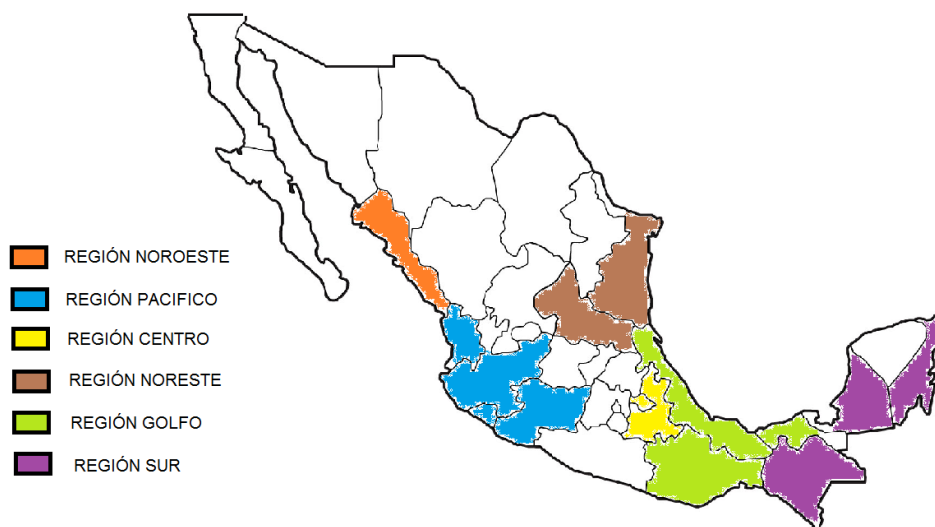


Figura 1. Regiones cañeras de México

Aspectos agronómicos

Temperatura y humedad

El intervalo óptimo de temperatura para el crecimiento de la caña de azúcar se encuentra entre los 26 y 30°C, temperaturas inferiores a los 21°C retardan el crecimiento de los tallos y conducen al aumento de sacarosa. La humedad o disponibilidad de agua, es quizás el factor más importante que el agricultor debe

atender, su déficit o exceso puede tener efectos perjudiciales en el cultivo; en algunos casos, la falta de humedad en el suelo puede afectar en forma significativa la producción de biomasa, en cambio, los excesos de humedad detienen el crecimiento radical, así como impiden la absorción normal de nutrientes básicos para la planta (Castillo y Silva, 2004).

Tipo de suelo

La caña de azúcar es una de las plantas más rústicas y resistentes a las condiciones adversas del medio, de tal manera que se adapta a condiciones ambientales muy diversas. Se cultiva en condiciones extremas, tanto en terrenos arcillosos muy pesados, como en turba casi pura, o en suelos extremadamente arenosos (Salgado *et al.*, 2013).

Variedades cultivadas

A las variedades cultivadas comercialmente les llaman cañas nobles, las cuales son híbridos entre *S. officinarum* y la especie silvestre *S. spontaneum* (Salgado *et al.*, 2013).

Una variedad es una adaptación de la especie provocada por cambios en su hábitat, originado por causas accidentales. En cambio, la expresión cultivar se refiere a la utilización de técnicas agronómicas, donde se distinguen caracteres permanentes, morfológicos, fisiológicos, citológicos, químicos, etc., desarrollados para la agricultura, silvicultura u horticultura; sin embargo, muchas veces se emplean indistintamente (Arévalo *et al.*, 2006).

Aunque no existe ningún acuerdo o norma que fije las reglas para la nomenclatura de las variedades. En todos los países donde se realiza hibridación se ha optado por asignar la nomenclatura a sus variedades tomando como base el país o lugar donde se efectúa la cruce, empleando siglas o abreviaturas para su identificación. Así las siglas CP hacen referencia a la Estación Experimental en Canal Point, Estados Unidos y Mex a la Estación Experimental del Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar en México (IMPA). Posteriormente, toman en cuenta el año en que se efectuó la cruce y finalmente otros incluyen el número que tenía el híbrido en el proceso de selección (Flores, 2001).

Híbrido L60-14

Proviene de la cruce de CP 52-1 x CP 48-103. La letra "L" hace referencia a que proviene de la Estación Experimental en Louisiana, Estados Unidos. Este híbrido posee tallos erectos, color verde amarillento, con manchas oscuras cerosas, corteza de dureza media, entrenudos cilíndricos de 2.5 a 3.0 cm y de 13 a 15 m de longitud, ligeramente en zig-zag, yemas de forma triangular, hojas de anchura media, arqueadas, color verde claro, espinas escasas, raíces abundantes y de profundidad media.

Dentro de las características agronómicas más interesantes de esta variedad es la buena brotación de la semilla comercial (trozos de la parte media del tallo con tres yemas), amacollamiento temprano, la mayor parte del tallo queda desnudo, prosperando bien en condiciones de riego o de temporal, con precipitación anual

de 1 500 a 1 800 mm y altitud de 0 a 1 600 m. Adaptándose bien a suelos profundos y bien drenados. Buen rendimiento de campo y soqueo (segundo corte del cultivo); es resistente a enfermedades como roya (*Puccinia melanocephala*), virus del mosaico (SCMV) y mancha de ojo o mancha de anillo (*Helminthosporium sacchari*) y tolerante al ataque de barrenador (*Diatraea considerata* o *Leptosphaeria sacchari*); sin embargo, es altamente susceptible al carbón (*Ustilago scitaminea*).

Esta variedad es de maduración temprana, rica en sacarosa con alta pureza en los jugos, con un contenido regular de fibra (IMPA, 1981). El reporte más actualizado acerca del rendimiento de esta variedad data de hace 21 años, indicando una producción de 178.75 t ha⁻¹ en plantaciones con riego (Márquez *et al.*, 1994).

Híbrido Mex 79-431

Proviene de la cruce de Co 421 X Mex 57-473, posee un tallo de medio a grueso, color verde-crema cuando está cubierto por la vaina, y verde amarillento en exposición al sol. Entrenudos de forma cilíndrica, yema abultada de forma pentagonal, hojas arqueadas de anchura media. La vaina es verde con tintes morados y ausencia de espinas (Flores, 2001).

Tiene buena brotación de semilla comercial (trozos de la parte media del tallo con tres yemas), buen amacollamiento y buena apariencia aún en sequía, excelente soqueo, floración escasa a regular (mayores porcentajes en altitudes medias de

400-800 m y menor en zonas altas de más de 1000 m). Presenta alto rendimiento en campo (más de 100 t ha⁻¹) en cultivo de riego.

Esta variedad es resistente al carbón, roya y escaldadura, tolerante al mosaico, a la mancha de ojo, su maduración es media y es rica en sacarosa (más de 14 %). Se propaga en muchos ingenios de México bajo cultivo de temporal con buenos resultados. Se recomienda vigilar su comportamiento industrial porque es alta en fibra.

Mex 79-431 es una de las mejores variedades comerciales mexicanas destacada por ser de buena calidad agroindustrial, representa junto con Mex 57-473, Mex 68-P-23 y Mex 69-290 el 62% de la superficie en cultivo comercial (400 000 ha) (Flores, 2001).

Una buena variedad comercial se considera aquella con alto rendimiento por hectárea en relación con el tiempo, costo y facilidad de producción, que además sea fácil de cosechar, tolerante al conjunto de condiciones climáticas y del suelo, a plagas y enfermedades, y que tengan buen soqueo.

Micropropagación

Es una de las técnicas del cultivo de tejidos que permite la multiplicación vegetativa a partir de segmentos de tejido, órganos, células, etc. Este tipo de reproducción asexual genera individuos idénticos a la planta progenitora (Simón y Moysset, 2006).

Existen tres vías para la micropropagación: 1) a partir de yemas axilares, 2) organogénesis de *novo* y 3) embriogénesis somática.

Yemas axilares

Los vástagos se desarrollan a partir de las yemas laterales que se encuentran en las axilas de las hojas, consiste en cultivar en un medio nutritivo un segmento nodal que lleva una yema (Figura 2) (Pierik, 1990).

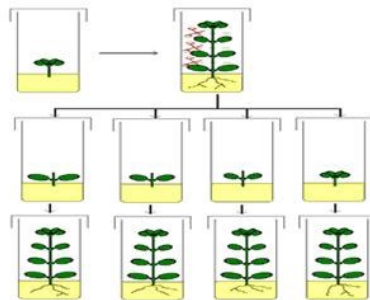


Figura 2. Micropropagación por yemas

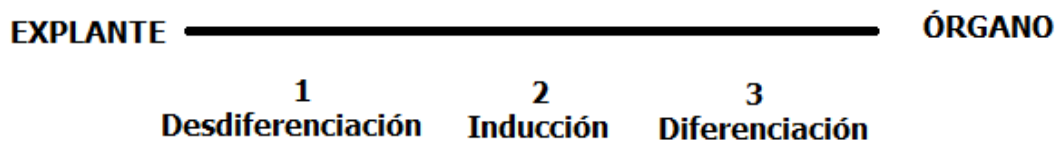
La producción de plantas por este medio ha demostrado ser un método confiable y práctico, es una manera sencilla de obtener nuevos brotes idénticos a la planta madre.

Organogénesis *de novo*

La organogénesis *de novo* da lugar a la formación de una estructura unipolar, principalmente un primordio de brote o raíz inducido a partir de un segmento de tejido o un órgano, cuando éste es cultivado en presencia de reguladores de crecimiento. Puede darse de manera directa o indirecta. Por la vía directa, los órganos se generan sin una fase previa de callo (agregado de células

desorganizadas y escasamente diferenciadas); en cambio, por la vía indirecta primero se forma un callo y de éste se derivan los órganos.

La secuencia de eventos para la organogénesis *de novo* se describe de la siguiente manera:



Embriogénesis somática

Se refiere a la formación de embriones a partir de células somáticas sin la fusión de gametos. La embriogénesis puede acompañarse de la formación de callo o de manera directa al igual que la organogénesis *de novo* (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994).

Medio de cultivo

Su función es mantener vivas las células cultivadas e inducir la formación de órganos y plantas. Los componentes de un medio de cultivo para células vegetales pueden clasificarse en:

- 1) Sales minerales (N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, B, Mo, Mn, Co, Zn, Cu, Cl, I)
- 2) Compuestos orgánicos (carbohidratos, hormonas, reguladores de crecimiento, vitaminas, entre otros)

3) Compuestos naturales complejos (extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de plátano, caseína hidrolizada, jugo de naranja y tomate.

4) Fuente de carbono (sacarosa, glucosa, fructosa)

5) Soporte (agar, gelrite, fitagel)

6) Materiales inertes (carbón activado) (Abdelnour- Esquivel y Vicent, 1994).

Fitohormonas y reguladores de crecimiento

Las hormonas vegetales o fitohormonas son sustancias elaboradas por las plantas (de manera endógena) que regulan su respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura, humedad, etc., y controlan los procesos esenciales para su desarrollo (Doerner 2000; Crozier *et al.*, 2000). Las fitohormonas, a diferencia de las hormonas animales, no son producidas en glándulas u órganos especializados, sino en células diferenciadas, y tienen su acción en lugares distintos al de origen. Por otra parte, si son obtenidas de manera sintética (no producidas por la planta) por síntesis en un laboratorio son denominados reguladores de crecimiento. Estos compuestos en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican el desarrollo de las plantas (White *et al.*, 1988; Hidalgo e Hidalgo, 2011).

Las principales hormonas vegetales son las auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010; Audesirk *et al.*, 2003).

Auxinas

Las auxinas regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas como la (elongación de las células, la dominancia apical, abscisión de las hojas, desarrollo de las yemas florales, desarrollo del fruto, diferenciación vascular, entre otros. Estas se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice del tallo y su forma predominante es el ácido indolacético (AIA), (Ludwig-Müller y Cohen, 2002; Taiz y Zeiger, 2006).

Citocininas

Se denominan citocininas por estimular la citocinesis o división celular, promueven la germinación y retrasan la senescencia, se sintetizan en la raíz y se transportan a través del xilema a otros órganos de la planta (White *et al.*, 1988; Murray, 2005; García *et al.*, 2006; Campbell y Reece, 2007).

Las citocininas en sí mismas presentan pocos efectos en las células en cultivo *in vitro*, pero cuando se aplican junto con auxinas, las células cultivadas comienzan a dividirse y diferenciarse. Tales efectos dependen en gran medida de la concentración de los reguladores (Cuadro 1). Comercialmente son más utilizadas para promover el rebrote de las yemas axilares y la formación de brotes adventicios (Murry, 2005).

El primer compuesto con propiedades de citocinina que se logró identificar fue la 6-furfuril aminopurina (cinetina), aislada del esperma de arenque (Barceló-Coll *et al.*, 1995; Amasino, 2005).

Dentro de las citocininas, 6-bencilaminopurina (BAP) se utiliza más que la 6-furfurilaminopurina (cinetina) y la 6-(4-hidroxi-3-metil-2-trans-butenoamil) (zeatina), ya que es un compuesto muy activo y se encuentra disponible a un precio razonable, es usado comúnmente para promover la morfogénesis (George, 1993).

Cuadro 1. Procesos del desarrollo controlados por la combinación de auxinas y citocininas (Tomado de Usui *et al.*, 1996).

FORMACIÓN DE YEMAS ADVENTICIAS			
Promoción:	auxina	<	citocinina
Inhibición:	auxina	>	citocinina
FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS			
Promoción:	auxina	>	citocinina
Inhibición:	auxina	<	citocinina
FORMACIÓN DE CALLO			
Promoción:	auxina	>	citocinina
Inhibición:	auxina	<	citocinina

También se consideran citocininas otros compuestos de origen no vegetal, y derivados sintéticos de la difenilurea como el forclorfenuron (CPPU) y el thidiazuron (TDZ) que actúan como análogos estructurales de la molécula natural.

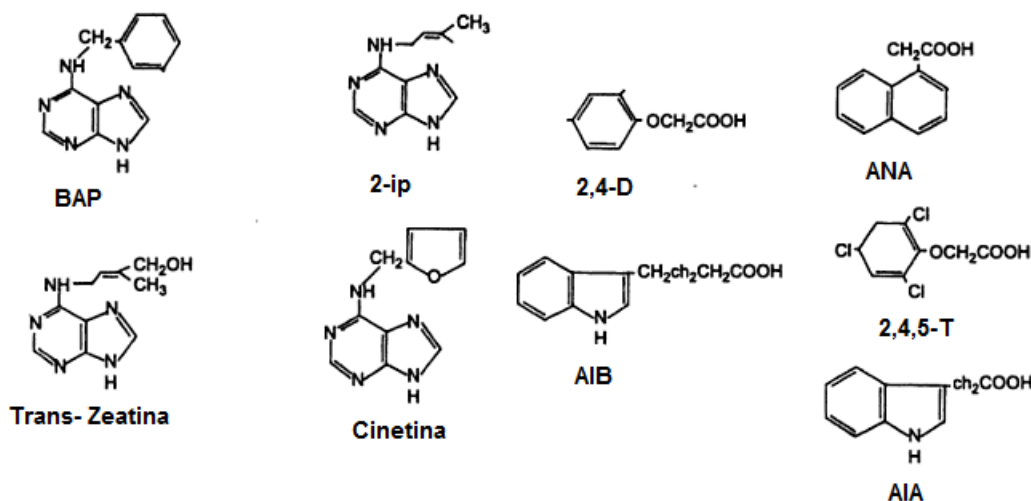


Figura 3. Estructura química de fitohormonas y reguladores de crecimiento (Tomada de Baran y Ghosh, 2005).

Thidiazuron

El thidiazuron es una fenilurea (N-fenil-N'-1, 2, 3-thidiazol-5-ilurea), compuesto que puede emular efectos similares a las citocininas o a las auxinas. Es capaz de inducir no solo la producción de brotes adventicios y/o axilares a través de organogénesis, sino también, embriogénesis somática como ocurre comúnmente en respuesta de auxinas (Shan *et al.*, 2000). Aunque no conserva la misma estructura base de adenina como otras citocininas sintéticas (cinetina y BA), si posee la misma actividad biológica que éstas. Su mecanismo de acción es aún

desconocido. Originalmente fue considerado como un defoliante en el algodón. Después ha sido utilizado en el cultivo *in vitro* de especies recalcitrantes y muchas plantas leñosas. El TDZ ha surgido como un eficaz bio-regulador de la morfogénesis en el cultivo de tejidos de muchas especies y es considerado uno de los inductores más potentes en la formación de nuevos brotes (Baran y Ghosh, 2005; Murthy *et al.*, 1998; Jordán y Casaretto, 2006).

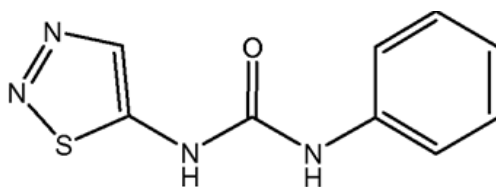


Figura 4. Estructura química de thidiazuron

Micropropagación en caña de azúcar

Baksha *et al.* (2002) evaluaron diferentes combinaciones y concentraciones de BAP (0.5-2.0 mg L⁻¹), BAP más cinetina (0.5-2.0 mg L⁻¹; 0.1-0.5 mg L⁻¹) y BAP más ácido indolbutírico (AIB) (0.5-2.0 mg L⁻¹; 0.1-0.5 mg L⁻¹) para cultivar ápices de la variedad Isd-28. El mayor porcentaje (75%) de regeneración de brotes (5 brotes por explante) se obtuvo en medio MS suplementado con BAP (2.0 mg L⁻¹) y AIB (0.5 mg L⁻¹).

Asimismo, Karim *et al.* (2002) propusieron un protocolo de inducción de callo y regeneración de dos variedades de caña de azúcar (Isd-28, Isd-16). El mayor porcentaje de inducción de callo (90 y 100% respectivamente), se presentó en un medio MS enriquecido con 3 mg L⁻¹ de 2,4-D y 10% de agua de coco, en tanto que

en el medio suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de AIB se observó 92 y 100% de formación de brotes adventicios, es decir 12 y 15 brotes por explante. El medio más eficiente en el porcentaje de enraizamiento contenía 3.0 mg L⁻¹ de ANA, y mostró 85 % de enraizamiento en la variedad Isd-28 y 97 % en la variedad Isd-16.

Por su parte, Franklin *et al.* (2006) reportaron un método de regeneración de un híbrido de caña de azúcar (CoC671), utilizando segmentos de nervadura central. Ellos observaron numerosas estructuras globulares, las cuales se diferenciaron en brotes adventicios cuando las nervaduras se cultivaron en un medio MS con 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.1 mg L⁻¹ de BAP más 0.1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA). Obteniendo hasta un 90 % de segmentos regenerados y 37 brotes en promedio después de 45 días de cultivo.

Por otro lado, Nieves *et al.* (2006) desarrollaron un protocolo de micropropagación para embriogénesis somática en *Saccharum* spp, utilizando 2,4-D (1.5 y 3 mg L⁻¹) en combinación con un bioregulador denominado PECTIMORF (3, 5 y 7 mg L⁻¹), utilizado para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de callo, catalizar la desagregación en suspensiones celulares e incrementar el desarrollo y vigor de las vitroplantas, así como también activa mecanismos de defensa de las plantas (González-Suárez *et al.*, 2000). La combinación de 5 mg L⁻¹ de PECTIMORF con 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D mostró efecto positivo sobre el número de

embriones por gramo de peso fresco y en la homogeneidad de éstos en los estados más avanzados de desarrollo (Nieves *et al.*, 2006).

Por otra parte, Shimelis *et al.* (2014) analizaron el efecto de la combinación de BAP y cinetina (0-3.0 y 0-1.0 mg L⁻¹, respectivamente), en la formación de brotes adventicios de las variedades C86-12 y C86-56. El número más alto de brotes por explante (33.8) para la variedad C86-12 se observó con la combinación de 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de cinetina; mientras que para la variedad C86-56 el mayor número de brotes por explante (25.6) se obtuvo con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 1.0 mg L⁻¹ de cinetina. La misma combinación y las mismas concentraciones fueron probadas por Tolera *et al.*, (2014) en las variedades B41-227 y N14. Estos autores lograron el mayor número de brotes por explante (34 brotes) en la variedad B41-227 con 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ cinetina y en N14 el mayor número de brotes (21 brotes) lo obtuvieron con 2.0 mg L⁻¹ de BAP.

Sustratos

Burés (1998) define un sustrato como cualquier medio que se utilice para cultivar plantas en contenedores. Por otra parte, Barbado (2005) refiere al sustrato como todo material sólido distinto del suelo colocado en un contenedor que en forma pura o de mezcla permite el desarrollo del sistema radical y crecimiento de la planta. En lenguaje hidropónico, los sustratos son materiales en los cuales se desarrollan las raíces de las plantas, estos pueden ser sólidos o líquidos.

Las materiales que comúnmente se utilizan como sustratos pueden ser de origen orgánico o inorgánico. Dentro de los orgánicos están la cascarilla de arroz, aserrín, fibra de coco, etc. En los sustratos inorgánicos se encuentran el tezontle (lava volcánica roja o negra), perlita, vermiculita, piedra pómez, arena y escoria de carbón, entre otros (Barbado, 2005).

Las características del sustrato le pueden conferir propiedades como: composición, masa, densidad, rugosidad, estructura interna, forma, características superficiales y tamaño. Las características físicas y químicas de un sustrato se determinan por la combinación de la estructura que generan las partículas de un sustrato y las características del material (Burés, 1997).

Dentro de las propiedades físicas de los sustratos se encuentra la porosidad, una característica que desde el punto de vista físico distingue a los sustratos de los suelos naturales, ya que los sustratos tienen en general mayor porosidad (poros de mayor tamaño). La porosidad se refiere a la propiedad que tiene algunos materiales de dejar espacios vacíos entre partículas y estos espacios estarán ocupados por aire y agua. El valor óptimo de porosidad de un sustrato se sitúa entre un 80 y 85%. El diámetro de los poros condicionará la aireación y retención de agua. La densidad, es la propiedad que indica la cantidad de masa por unidad de volumen. Si se refiere al material sólido que lo compone se trata de densidad real. Por otro lado, si se relaciona el componente sólido más el espacio poroso se trata de densidad aparente. Los valores de esta propiedad se prefieren bajos,

entre 0.7 y 1 g/cm³. La estructura de los sustratos puede ser, fibrosa como las de origen vegetal o en forma de granos como las de origen mineral. La granulometría es una característica que influye en la capacidad de retención de agua ya que los poros aumentan según aumenta el tamaño de las partículas del sustrato (Burés, 1997; Tello *et al.*, 2004; Barbado, 2005).

Las propiedades químicas de los sustratos están dadas por la disolución de los propios sustratos, lo que desencadena en reacciones de intercambio de iones, estas propiedades son principalmente el pH y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Burés, 1997).

Perlita

Es un material que se obtiene al exponer rocas volcánicas de sílice a temperaturas de 1000 a 1200°C y que luego sufren enfriamiento rápido (Cadahía, 2005). Se presenta en forma de partículas blancas entre 1.5 y 6 mm, con una densidad baja, posee una buena retención de agua de hasta cinco veces su peso y una elevada porosidad, la CIC es nula y la durabilidad depende del tipo de cultivo (Terrés *et al.*, 2001). Es uno de los sustratos más utilizados a gran escala por los productores y es completamente inerte (<http://www.hydrocultura.com.mx>).

Cuadro 2. Propiedades químicas y físicas de la perlita (tomado de Zamora *et al.*, 2005; Pagés y Matallana, 1984).

pH	MO (%)	CE dS.m ⁻¹	Ca mg L ⁻¹	Mg mg L ⁻¹	K mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹	Da g cm ³	Dr g cm ³	Porosidad total
8.0	1.37	0.11	16.6	10.09	1.56	0.11	0.18	1.03	95

CE: Conductividad eléctrica, MO: Materia orgánica, Da: Densidad aparente, Dr: Densidad real

Vermiculita

Se obtiene por la exfoliación de mica sometida a temperaturas superiores a los 800 °C. Su densidad aparente es de 90 a 140 Kg m⁻³, se presenta en escamas de 5 a 10 mm de longitud. Puede retener hasta 350 L m⁻³ de agua y posee alta capacidad de aireación, aunque tiende a compactarse. La CIC de este sustrato es prácticamente nula (Terrés *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Propiedades químicas y físicas de la vermiculita (tomada de Pagés y Matallana, 1984; Burés, 1997)

pH	MO (%)	CE dS.m ⁻¹	Ca mg L ⁻¹	Mg mg L ⁻¹	K mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹	Da g cm ³	Dr g cm ³	Porosidad total
7	8.96	0.02	175	390	31	3	0.146	2.52	94

CE: Conductividad eléctrica, MO: Materia orgánica, Da: Densidad aparente, Dr: Densidad real

Tezontle

El tezontle es una roca ígnea extrusiva de origen volcánico que se origina por el enfriamiento de lava, está conformado de silicatos de aluminio y bióxido de hierro (Raviv *et al.*, 2002). Es un sustrato inerte, de alta porosidad y área superficial.

Existen varios tipos de tezontle que se caracterizan por su viscosidad, color y contenido de Fe, Mg, Ca y Mn esto se relaciona con la cantidad de sílice en las rocas y la temperatura de erupción por tanto, sus características físicas se determinan por su composición mineralógica (Raviv *et al.*, 2002)

Su textura es vesicular (porosa), es un material ligero, poco resistente, con buen drenaje, casi no aporta nutrientes, guarda el calor, no es permeable ni aislante.

En México el tezontle es ampliamente utilizado en la producción de hortalizas y flores en cultivos hidropónicos (Vargas *et al.*, 2008), por su bajo costo, disponibilidad y características físicas que varían con respecto al tamaño de partícula (Anicua, 2008).

Cuadro 4. Propiedades físicas y químicas del tezontle (tomada de García *et al.*, 2001)

pH	MO (%)	CE dS.m ⁻¹	Ca mg L ⁻¹	Mg mg L ⁻¹	K mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹	Da g cm ³	Dr g cm ³	Porosidad total
6.9	<1	2.7	48	30	580	7.6	0.42	2.24	63

CE: Conductividad eléctrica, MO: Materia orgánica, Da: Densidad aparente, Dr: Densidad real

Micropropagación utilizando sustratos

En el cultivo *in vitro* de seis clones de nogal (D152, G1, MR8, MR9, HA3-1, HA2-13) se obtuvieron porcentajes más altos de enraizamiento (100 %), número de raíces primarias (231) y raíces secundarias (14) a partir de microesquejes

cultivados en una mezcla de gelificante diluido, medio DKW a $\frac{1}{4}$ de concentración de macroelementos y vermiculita 250:200 (v/v) que en los microesquejes crecidos en agar (Jay-Allemand *et al.*, 1992).

Afreen-Zobayeb *et al.* (2000) probaron una mezcla de vermiculita y pulpa de papel como material de soporte para la micropropagación autotrófica de plántulas de papa (*Ipomea batatas*). El estudio reveló que las plantas cultivadas en la mezcla de vermiculita y pulpa de papel mostraron mayor crecimiento, peso seco de hojas, tallos, raíces, tasa fotosintética que las plantas crecidas en los medios de cultivos gelificados con agar.

El uso de bagazo de caña de azúcar como sustituto de agar, mostró mejores resultados en el porcentaje de enraizamiento (100 %), número de raíces por explante (25 raíces) y longitud promedio del brote (4.6) en microesquejes de manzana (*Malus prunifolia*), a los 38 días de cultivo en medio MS a la mitad de concentración de sales y adicionado con 0.09 mg L^{-1} de AIB, observaron también que el tamaño de partícula tuvo un impacto significativo en los parámetros evaluados, presentándose los mejores resultados en partículas menores de 0.18 mm (Mohan *et al.*, 2004).

Martínez-Hernández *et al.* (2006) evaluaron la germinación, multiplicación, enraizamiento y supervivencia *in vitro* de tres patrones de cítricos (*Citrus volkameriana*, *Citrus swingle* y C-35 cultivados en medio MS y sustratos inertes (vermiculita, perlita y tezontle). Los mejores resultados para los tres patrones en

cuanto a la germinación y enraizamiento se observaron en vermiculita, la máxima tasa de multiplicación se obtuvo en vermiculita (*Citrus volkameriana* y C-35) y tezontle, (*Citrus swingle*) y el mayor porcentaje de supervivencia se encontró con la vermiculita.

Por otra parte, Flores (2013), desarrolló un protocolo de regeneración *in vitro* de dos especies de orquídea (*Laelia anceps* y *Epidendrum sp.*) utilizando perlita, tezontle y fibra de coco. Respecto a la longitud de los brotes los mejores resultados se observaron a los 45 días en la mezcla de perlita-tezontle; sin embargo, a los 90 días la longitud fue mayor en fibra de coco-tezontle y agar. Para el número de hojas y raíces no existieron diferencias significativas entre los distintos sustratos a los 45 y 90 días.

Por otro lado, Jimarez (2014) implementó un protocolo de regeneración *in vitro* de plantas de chile habanero variedad Naranja con sustratos. Los mejores resultados en supervivencia se obtuvieron con la combinación MS y perlita-tezontle (99 %), para la inducción de brotes a partir de embriones, la mejor combinación fue vermiculita-perlita con 3.16 brotes en promedio, para la fase de enraizamiento las combinaciones que alcanzaron el 100% de brotes enraizados fueron perlita-tezontle con MS (100 y 25 %) y vermiculita-perlita con Arnon y Hoagland, Finalmente en la fase de aclimatación, las plantas provenientes de sustratos en comparación con agar, exhibieron mejor comportamiento y supervivencia *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización física de sustratos

Se realizó la caracterización física de tres sustratos tezontle (T), perlita (P) y vermiculita (V), así como las mezclas de ellos, en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1 con un tamaño de partícula de 0.25 mm.

Determinación de densidad aparente (Da)

Para la determinación de densidad aparente (Da) se aplicó la fórmula de masa sobre volumen.

$$D = \frac{m}{v}$$

Para determinar el volumen, se emplearon permeámetros (cilindros con perforaciones en la base) en los cuales se selló el drenaje con cinta adhesiva; posteriormente, se registró el peso del permeámetro vacío, y luego se llenó con agua, registrándose el peso; a este último valor se le restó el peso inicial, el valor obtenido corresponde al volumen del permeámetro.

La masa se determinó, saturando los sustratos en recipientes con agua durante 24 h, una vez saturados, los permeámetros se llenaron a su máxima capacidad con el sustrato saturado y se registró el peso, posteriormente, se retiraron las cintas adhesivas y se esperó a que se drenara por completo, se registró nuevamente el peso del permeámetro con el sustrato ya drenado. Después, las muestras se

colocaron en charolas de aluminio etiquetadas (registrando el peso de la charola vacía) y se colocaron en una estufa a temperatura constante (70 °C por 24 h), las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se registró nuevamente el peso. La masa del sustrato resultó de la diferencia del peso total de la charola con el sustrato menos el peso de la charola vacía. El valor de D_A se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$D_A = \frac{\text{peso seco de la muestra}}{\text{volumen del permeámetro}}$$

Determinación de porosidad

En la determinación de porosidad total (P_t), porosidad de aireación (P_{ai}) y retención de humedad (R_h) se manejaron las siguientes fórmulas.

Volumen total de poros (%) = $P_{s.sa} - P_{s.s}$

% $P_t = (\text{volumen total de poros}/V_p) * 100$

$V_{ai} = P_{s.sa} - P_{s.d}$

% $P_{ai} = (V_{ai}/V_p) * 100$

% $R_h = \% P_t - \% P_{ai}$

$V_p =$ Volumen del permeámetro

$V_{ai} =$ Volumen de aireación

$P_{s.sa} =$ Peso del sustrato saturado

$P_{s.d} =$ Peso del sustrato drenado

$P_{s.s} =$ Peso del sustrato seco

Pt = Porosidad total

Pai = Porosidad de aireación

Rh = Retención de humedad

Determinación del porcentaje de retención de humedad

Para determinar la retención de humedad se utilizó el método propuesto por De Boodt *et al.* (1974) y Ansorena (1994), que se basa en aplicar tensiones de 0 a 100 cm a los sustratos saturados, los cuales se colocaron en embudos. En las curvas de retención de humedad se consideraron los siguientes parámetros (Burés, 1997): agua difícilmente disponible (ADD), es el agua que queda retenida en el sustrato tras aplicar una tensión de 100 cm de columna de agua; agua de reserva (AR), es el porcentaje en volumen de agua que se libera entre 50 y 100 cm de columna de agua de tensión sobre el sustrato; agua fácilmente disponible (AFD), es el porcentaje en volumen de agua que se libera entre 10 y 50 cm de tensión en columna de agua sobre el sustrato; agua no disponible (AND), es el porcentaje en volumen de agua que se libera al aplicar una tensión de 0-10 cm de columna de agua.

Micropropagación

Experimento 1. Inducción de brotes adventicios

Material vegetal

Se utilizaron brotes adventicios de 1.5 cm de longitud (explantes) regenerados *in vitro* de las variedades Mex 79-431 y L 60-14.

Medio de inducción de brotes adventicios

Cinco explantes se colocaron en frascos de vidrio de 150 mL de capacidad que contenían 30 mL de la mezcla de sustrato vermiculita-perlita (3:1) con tamaño de partícula 0.5 mm previamente caracterizada por Jimarez (2014) y vermiculita-perlita (2:1) con tamaño de partícula de 0.25 mm y saturada con 30 ± 5 mL de tres medios de cultivo: 1) sales basales de Murashige y Skoog (1962) (MS) (testigo); 2) sales MS con 2 mg L^{-1} de BAP y 0.1 mg L^{-1} de cinetina y 3) Sales MS con 0.5 mg L^{-1} de thidiazuron (TDZ). El tratamiento testigo no contenía reguladores de crecimiento y fue gelificado con 7 g L^{-1} de agar.

Todos los medios fueron suplementados con 20 g L^{-1} de sacarosa; el pH de los mismos se ajustó a 5.7 ± 0.1 y se esterilizaron en una autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Después de 30 días de iniciado el cultivo se evaluó el porcentaje de supervivencia de los explantes, el número de explantes que formaron brotes adventicios y el número de brotes que se formó en cada explante.

Condiciones de cultivo

Todos los cultivos permanecieron en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 16 h, e intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Diseño experimental

Para la inducción y multiplicación de brotes se utilizó un diseño factorial con tres factores: variedades (2), sustratos (3) y medios de cultivo (3) con 5 repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental consistió en un frasco con cinco explantes (1 repetición). Para el análisis de resultados se utilizó el programa SAS System 9.0 y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Experimento 2. Enraizamiento de brotes adventicios

Material vegetal

Se utilizaron brotes adventicios de 1.5 cm de longitud (explantes) de las variedades Mex 79-431 y L 60-14, regenerados *in vitro* en medio MS con 30 g L^{-1} de sacarosa gelificado con 7 g L^{-1} de agar.

Medio de enraizamiento

Tres nuevos brotes adventicios de 2 cm de longitud fueron colocados en cada frasco de vidrio de 150 mL de capacidad que contenían 30 mL de la mezcla de sustrato vermiculita-perlita (3:1) con tamaño de partícula 0.5 mm y vermiculita-perlita (2:1) con tamaño de partícula de 0.25 mm, saturados con medio MS con o sin 1 mg L^{-1} de ácido indolbutírico (AIB) y 20 g L^{-1} de sacarosa. En este medio los

brotos permanecieron 10 días y posteriormente se transfirieron a un medio fresco sin reguladores de crecimiento y los mismos sustratos. A los 20 días se evaluó el porcentaje de supervivencia, el porcentaje de enraizamiento y el número y longitud de raíces que formó cada brote.

Condiciones de cultivo

Todos los cultivos permanecieron en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 16 h, e intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Diseño Experimental

Para la fase de enraizamiento se utilizó un diseño factorial con tres factores: variedades (2), sustratos (3) y medios de cultivo (2). Cada tratamiento consistió de diez repeticiones, considerando como unidad experimental un frasco con tres brotes adventicios. Para el análisis de resultados se utilizó el programa SAS System 9.0 y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Aclimatación

Las plantas regeneradas se extrajeron del frasco que las contenía y sus raíces se lavaron con agua corriente hasta eliminar completamente el agar o el sustrato adherido a ellas, posteriormente se sumergieron en 1 g L^{-1} de solución fungicida (Ridomil Gold®, Syngenta, México) durante 5 min. Después, las plantas se colocaron en vasos de poliestireno (unicel) de 250 mL con peat moss (Agrolita ®) previamente humedecido a capacidad de campo. Los vasos se cubrieron con bolsas de polietileno transparente, las cuales se sujetaron con una liga para

mantener la humedad constante durante cuatro días. Después del cuarto día a la bolsa se le hicieron perforaciones hasta que esta fue retirada. Las plantas se regaron de acuerdo a sus requerimientos y cada 15 días se aplicó fertilizante (Miracle-Growth® All Purpose, Scotts Miracle-Gro Company, Marysville, OH, EE.UU.) a una concentración de 1 g L⁻¹. Cada 16 días durante dos meses se evaluó la supervivencia de las plantas, la longitud del tallo, el número de las hojas y el diámetro de tallo.

Diseño Experimental

Para la fase de aclimatación se utilizó un diseño factorial con tres factores: variedades (2), sustratos (3) y medios de cultivo (2). Cada tratamiento consistió de diez repeticiones, considerando como unidad experimental un recipiente de poliestireno con una planta. Para el análisis de resultados se utilizó el programa SAS System 9.0 y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Inducción de brotes

Supervivencia

Efecto de la variedad

La supervivencia de la variedad L 60-14 fue significativamente mayor (92%) a la observada para Mex 79-431 (Figura 5). La información acerca del cultivo *in vitro* de estas dos variedades es muy limitada. Sin embargo, la experiencia en campo evidencia que las industrias cañeras mexicanas prefieren entre estas dos variedades las características de Mex 79-431, ya que supera en superficie sembrada a la variedad L 60-14 (Salgado *et al.*, 2012). Los híbridos de caña en una región determinada, no muestran el mismo comportamiento cuando se cultivan en otro lugar. Por lo tanto, su comportamiento, adaptabilidad y rendimiento están en función de las condiciones ambientales en donde se desarrollan (Flores, 2001). Con base en lo anterior, podemos afirmar que en condiciones controladas como es el cultivo *in vitro* y en contraste con lo que se presenta en campo, la variedad L 60-14 muestra mayor vigor y por lo tanto mayor resistencia en dichas condiciones.

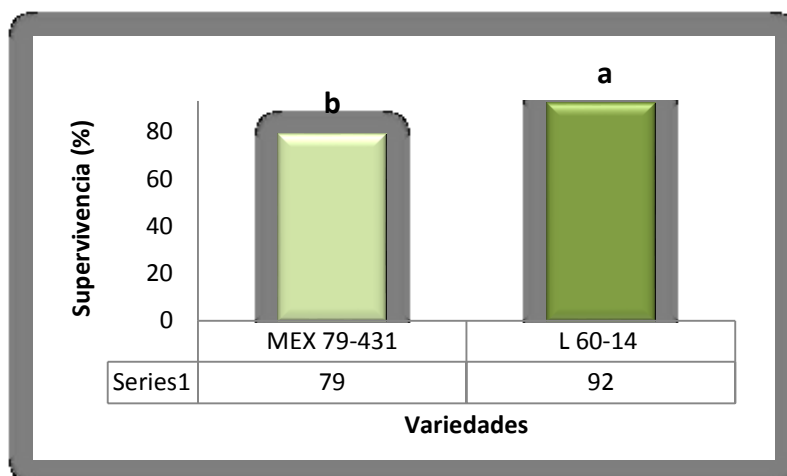


Figura 5. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la variedad (Mex 79-431 y L 60-14) en caña de azúcar después de 30 días cultivados en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Efecto del sustrato

La supervivencia de los brotes cultivados en la mezcla de vermiculita-perlita con tamaño de partícula 0.25 mm (S2) promovió valores de supervivencia estadísticamente iguales a la de los brotes crecidos en un medio gelificado con agar, en tanto que aquellos que permanecieron en vermiculita-perlita con tamaño de partícula 0.5 mm sobrevivieron en menor proporción (Figura 6). La alta supervivencia registrada en los explantes cultivados en la mezcla de sustratos con un tamaño de partícula 0.25 mm, podría deberse a que este tamaño al tener menos espacios de aire que el tamaño de partícula de 0.5 mm, brinda mejor soporte al explante, favorece el contacto del medio de cultivo con explante, la disposición de los nutrimentos del medio de cultivo y con ello el crecimiento. En contraste, Jimarez (2014) obtuvo porcentajes de supervivencia mayores al 90%

cuando germinó *in vitro* semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) en una mezcla perlita-vermiculita 3:1 (0.5 mm).

En la propagación *in vitro* de caña de azúcar es muy común que se presente oxidación debido a la liberación de fenoles. Una práctica común para reducir esta respuesta es la adición de agentes antioxidantes (cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico) o el cambio continuo de las plantas a medios frescos (Parreño, 2012).

Los resultados obtenidos permitieron observar que la oxidación fenólica fue considerablemente menor en los explantes cultivados en sustratos que en los medios con agar, debido a que la oxidación es causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, estos compuestos son exudados por las heridas del tejido dentro del medio y son atrapados por el agar, promoviendo una acumulación que se manifiesta como una mancha negra alrededor del explante (George, 1993). Los sustratos por otro lado, permiten un balance entre la aireación y la disponibilidad de agua, (Jay-Allemand *et al.*, 1992) favoreciendo la difusión de oxígeno, la respiración de las raíces y la reducción de la oxidación (Chavarria *et al.*, 1999; Labrousse *et al.*, 2012). Utilizar sustratos reduce los problemas de aireación y de oxidación, además de que reduce costos por adición de antioxidantes y por cambios continuos de medio de cultivo para evitar la intoxicación por fenoles oxidados.

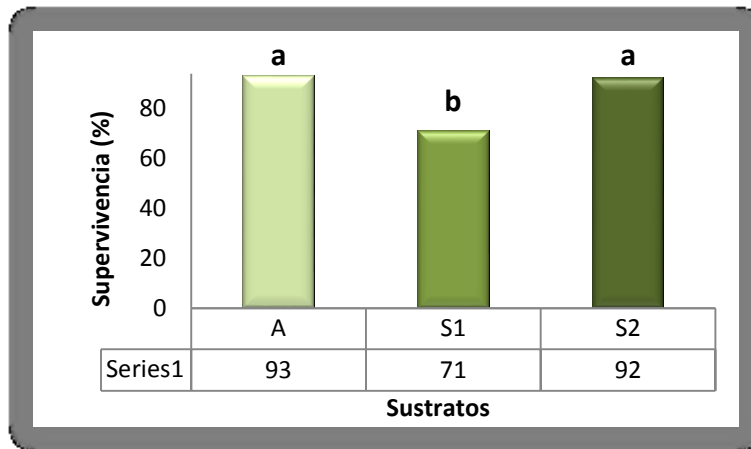


Figura 6. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto del sustrato en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días cultivados en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). A: agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm).

Efecto del medio de cultivo

Fue posible observar valores por arriba del 80% de supervivencia en los explantes que fueron cultivados en los distintos medios probados (Figura 7); no obstante, no se encontraron diferencias estadísticas entre ellos. Lo anterior indica que los distintos reguladores de crecimiento con los que se suplementaron los medios no influyeron significativamente en la supervivencia. En contraste, en *Geophila macropoda* (oreja de ratón) se observó que al incrementar las concentraciones de BAP aumentó el número de explantes hiperhidratados y oxidados (Martínez-Hernández *et al.*, 2006; Vargas-Castillo *et al.*, 2010). Las plantas hiperhidratadas u oxidadas usualmente mueren, debido a que la fotosíntesis y respiración no se llevan a cabo correctamente (Ziv, 2000).

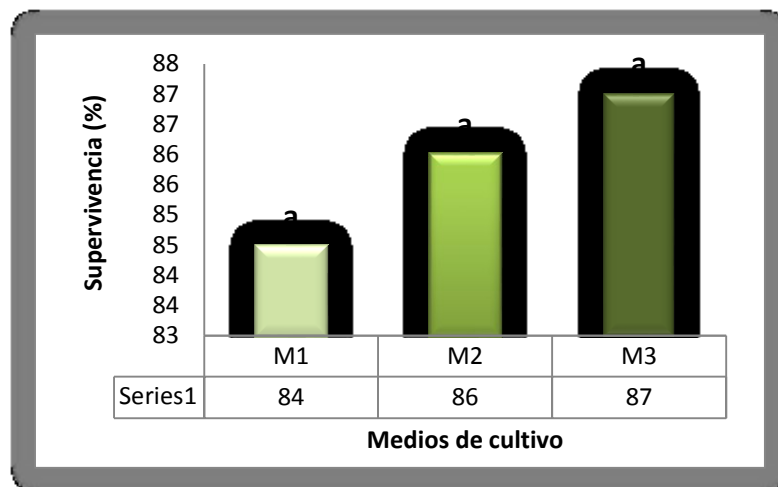


Figura 7. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días cultivados en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). M1: MS sin reguladores; M2: MS, 0.1 mg L⁻¹ cinetina, 2.0 mg L⁻¹ BAP; M3: MS, 0.5 mg L⁻¹ TDZ.

Efecto de la interacción variedad, sustrato y medio de cultivo (tratamientos)

Sólo se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos L-AM1, L-AM2, L-AM3, M-AM3, L-S1M1, M-S1M2, M-S2M1, L-S2M1, L-S2M2, L-S2M3 y el tratamiento M-S1M1 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.5 mm y medio 1). En los primeros tratamientos se obtuvo hasta 100% de supervivencia, mientras que en el M-S1M1 únicamente 33% de los explantes sobrevivió (Figura 8). El hecho de que en ambas variedades obtuvieran altos valores de supervivencia al utilizar sustratos, indica que esta variable no es afectada significativamente por éstos. La supervivencia está determinada por diversos factores entre los que se pueden mencionar estrés, edad, genotipo del material vegetal, concentración de los

componentes del medio de cultivo, contaminación por la selección de un método no adecuado de desinfección, falta de oxigenación en el medio, en otros.

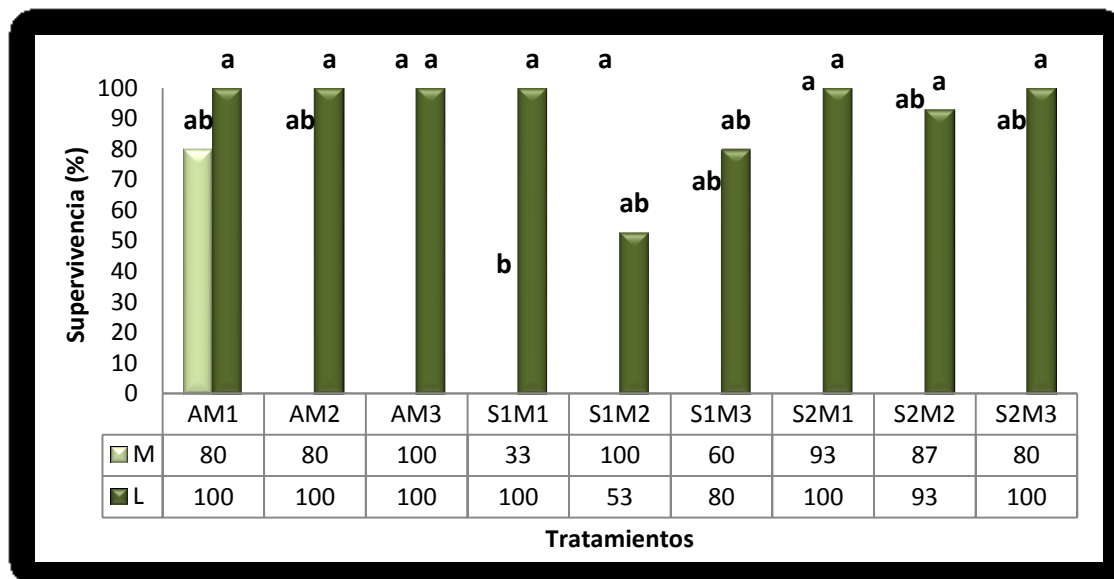


Figura 8. Supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamiento) en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días cultivados en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) M: Mex 79-431; L: L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); M1: sin reguladores; M2: 0.1 mg L⁻¹ cinetina, 2.0 mg L⁻¹ BAP; M3: 0.5 mg L⁻¹ TDZ.

Número de brotes por explante

Efecto de la variedad.

Los explantes de la variedad Mex 79-431 formaron un número de brotes por explante significativamente mayor (0.8) que la variedad L 60-14 (Figura 9).

Lo anterior, mostró que para esta variable el genotipo si tuvo un efecto significativo, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Tolera *et al.* (2014) y Shimelis *et al.* (2014) en caña de azúcar, quienes encontraron diferencias en cuanto a la formación de brotes entre las variedades B41-227 y N14, así como en la C86-12 y C86-56, respectivamente. Es interesante mencionar que a pesar del bajo porcentaje de supervivencia que presentó la variedad Mex 79-431, formó mayor número de brotes por explante que la L 60-14.

Del comportamiento de estas variedades en condiciones *in vitro* se conoce muy poco; sin embargo, se sabe que en campo la variedad L 60-14 tiene un abundante amacollamiento y en Mex 79-431 se considera bueno (Flores, 2001). Lo que indica que el comportamiento de cada variedad puede cambiar de acuerdo a las condiciones ambientales.

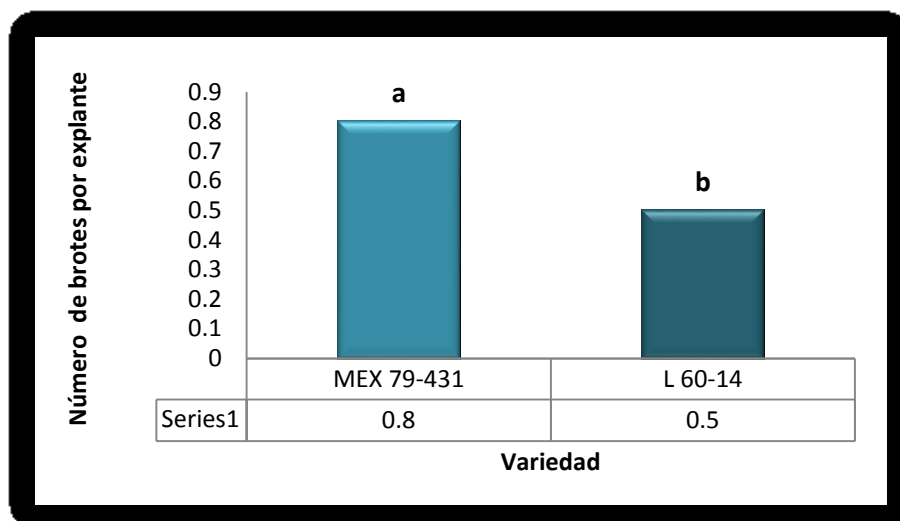


Figura 9. Número de brotes por explante por efecto de la variedad (Mex 79-431 y L 60-14) en caña de azúcar después de 30 días de cultivo en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Efecto del sustrato

El número de brotes formados por los explantes cultivados en los medios gelificados con agar fue estadísticamente superior (1.0) que el de aquellos crecidos en los sustratos 1 y 2 (S1 y S2) (Figura 10). Es decir, los dos sustratos probados se comportaron de la misma manera y resultaron menos eficientes que el agar para permitir la formación de brotes adventicios. Aunque los valores promedio en sustratos son bajos con respecto a agar, hasta el momento no se han reportado estudios acerca de la utilización de sustratos *in vitro* para la multiplicación de estas dos variedades.

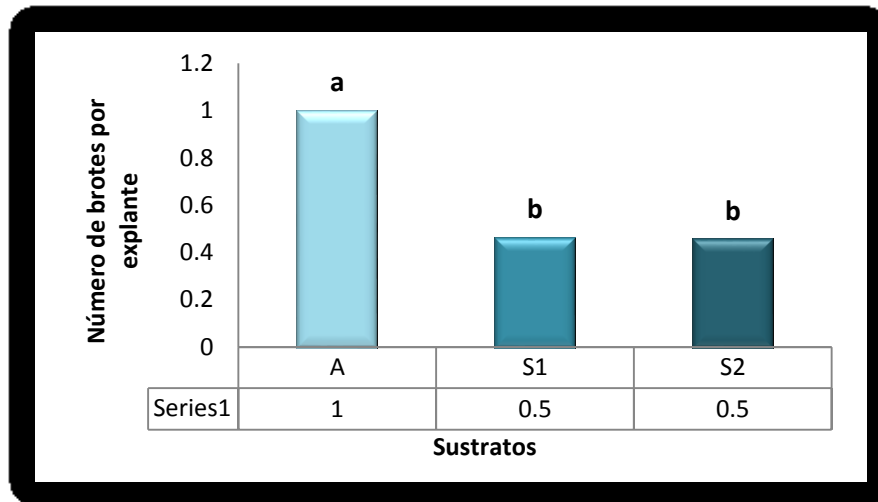


Figura 10. Número de brotes por explante por efecto del sustrato en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días de cultivo en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm).

Martínez-Hernández *et al.* (2006) no observaron diferencias significativas en la respuesta de los portainjertos de cítricos (*Citrus volkameriana*, *C. swingle* y C-35) cuando se cultivaron en sustratos inertes (vermiculita, perlita y tezontle) o agar, ya que afirman que, su función principal es de soporte para los explantes.

Por otra parte, con respecto al número de brotes, es posible que al reducir el tamaño de la partícula, se reduce también la porosidad y haya mayor retención de humedad en las partículas del sustrato, de esta manera no se promueve una adecuada movilidad y disponibilidad de los nutrimentos en el medio (Marulanda *et*

al., 2000). De acuerdo con lo reportado por Jimarez (2014), la mezcla de vermiculita-perlita con tamaño de partícula de 0.5 mm (sustrato 1) resultó ser el mejor para la formación de primordios de brote en explantes de hipocotilo de chile habanero (*Capsicum chininse*).

Efecto del medio de cultivo

Los explantes cultivados en el medio M2 (2.0 mg L⁻¹ BA, 0.1 mg L⁻¹ cinetina) formaron un número de brotes por explante estadísticamente igual que los crecidos en el medio M3 (0.5 mg L⁻¹ TDZ) (0.7-0.8), pero superior al de los explantes que permanecieron en el medio M1 (sin reguladores) (Figura 13). En contraste, Shimelis *et al.* (2014) obtuvieron 16 brotes por explante en la variedad C86-12 cuando éstos se cultivaron en un medio con la misma concentración de reguladores del medio M2 (2 mg L⁻¹ de BAP y 0.1 mg L⁻¹ de cinetina) y 12.8 brotes en la variedad C86-56. Asimismo, Tolera *et al.* (2014) con esta misma combinación y concentración de reguladores de crecimiento obtuvieron 3.5 brotes por explante para la variedad B41-227 y 16.5 brotes por explante en la variedad N14. Por otro lado, Baksha *et al.* (2002) encontraron que cultivar meristemas de la variedad Isd-28 en un medio similar al M2 indujeron la formación de 3 brotes por explante; aunque observaron un número mayor de brotes por explante (5 brotes) con la combinación de 2 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de cinetina.

Cabe señalar, que en el medio M2 con agar se presentaron abundantes brotes en forma arrochetada cuyas hojas eran rizadas y quebradizas (anormales), característica que impidió individualizarlos (Figura 11). Esto se vio reflejado en un bajo número de brotes por explante, puesto que en la evaluación y análisis sólo se consideraron los brotes normales.



Figura 11. Brotes arrochetados de la variedad Mex 79-431 de caña de azúcar obtenidos en el medio M2 con agar.

Las hojas de los macollos obtenidos además mostraban signos de vitrificación, también llamada hiperhidricidad. La vitrificación es un desorden fisiológico que se observa cuando hay un aumento en el contenido de agua en los tejidos y puede estar influenciada por el agente gelificante (Franck *et al.*, 2004). Dicha anomalía también se puede atribuir a las altas concentraciones de los reguladores de crecimiento y su interacción con la variedad. En varias especies se ha observado que concentraciones mayores a 2 mg L⁻¹ de BAP provocan una

disminución en el número de brotes e incrementan la frecuencia de explantes hiperhidratados y oxidados (Chavarría *et al.*, 1999; Vargas-Castillo y Abdelnour-Esquivel, 2010).

Por otro lado, el TDZ es un compuesto sintético que puede actuar como citocinina o auxina, y está relacionado con la respuesta morfogénica (Murthy *et al.*, 1998). Pertenece al grupo de las fenilureas, sustancias conocidas por su alta acción como citocinina, y actúa estimulando la síntesis de citocininas endógenas y de otros metabolitos afines a ellas (Mok *et al.*, 1982).

En algunas especies como *Tillandsia macdougalli*, *Tillandsia violacea*, *Echeveria pumila* cv. Glauca y *Saccharum* spp. híbrido cv. CP84-1198, el TDZ promovió mayor número de brotes por explante y un número de hojas que otros reguladores de crecimiento como cinetina, 2,4-D o AIA (Gallo-Meagher *et al.*, 2000; Vásquez, 2014; Bulbarela, 2014). En contraste, Pérez *et al.* (2002) mencionan que el uso de este compuesto produjo brotes atrofiados, achaparrados y amarillentos en la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40 de guayabo (*Psidium guajava* L.).

En la presente investigación los brotes obtenidos en el medio que contenía TDZ (M3) no mostraron anomalías en ninguna de las dos variedades estudiadas (Figura 12).

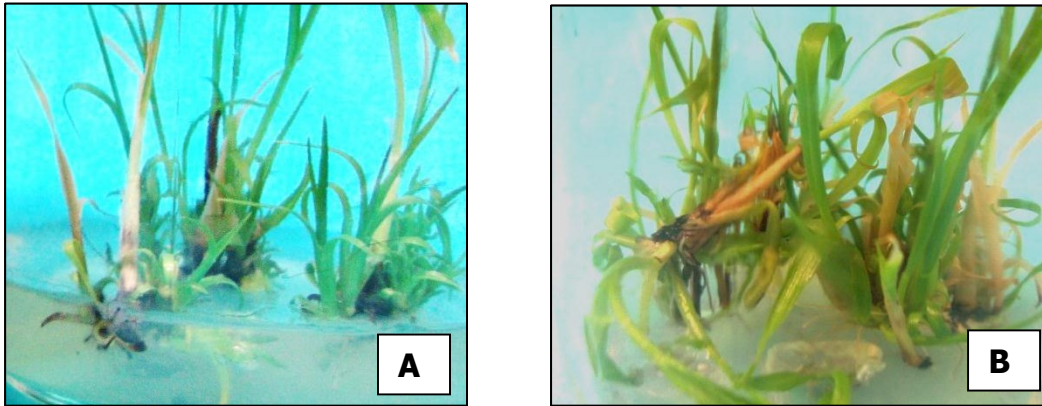


Figura 12. Brotes normales de dos variedades de caña de azúcar obtenidos en el medio M3 y agar. A. L 60-14. B. Mex 79-431.

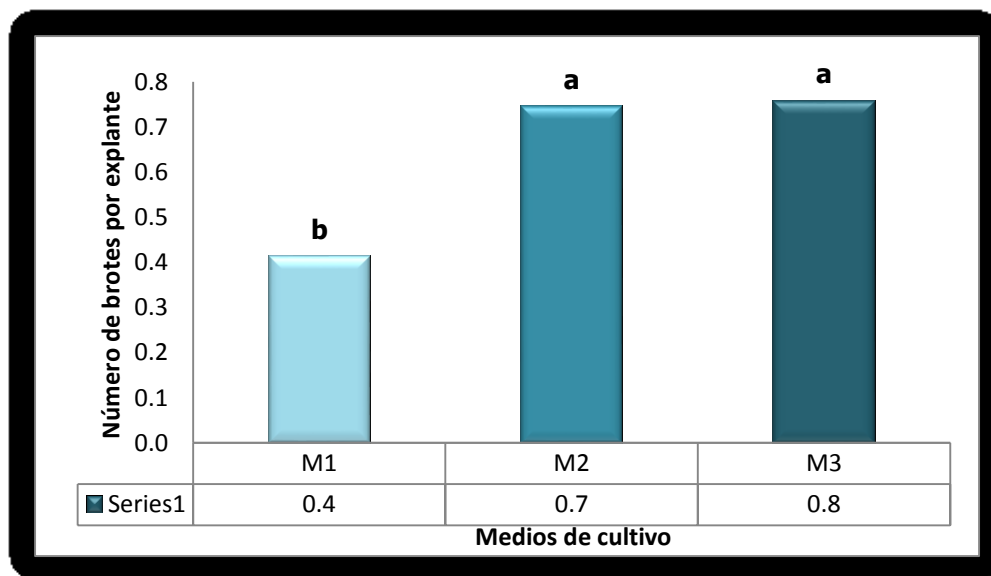


Figura 13. Número de brotes por explante por efecto del medio de cultivo en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días de cultivo en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). M1: sin reguladores; M2: 0.1 mg L⁻¹ cinetina, 2.0 mg L⁻¹ BAP; M3: 0.5 mg L⁻¹ TDZ.

Efecto de la interacción entre variedad, medio de cultivo y sustrato (tratamientos)

Los resultados permitieron observar que la combinación del medio M2 (2.0 mg L⁻¹ de BA y 0.1 de cinetina) y agar, en la variedad Mex 79-431 fue superior (2.1) a todos los tratamientos probados, a excepción de la combinación del medio M3 (0.5 mg L⁻¹ TDZ), agar y ambas variedades (2.0 y 1.1, respectivamente) (Figura 14).

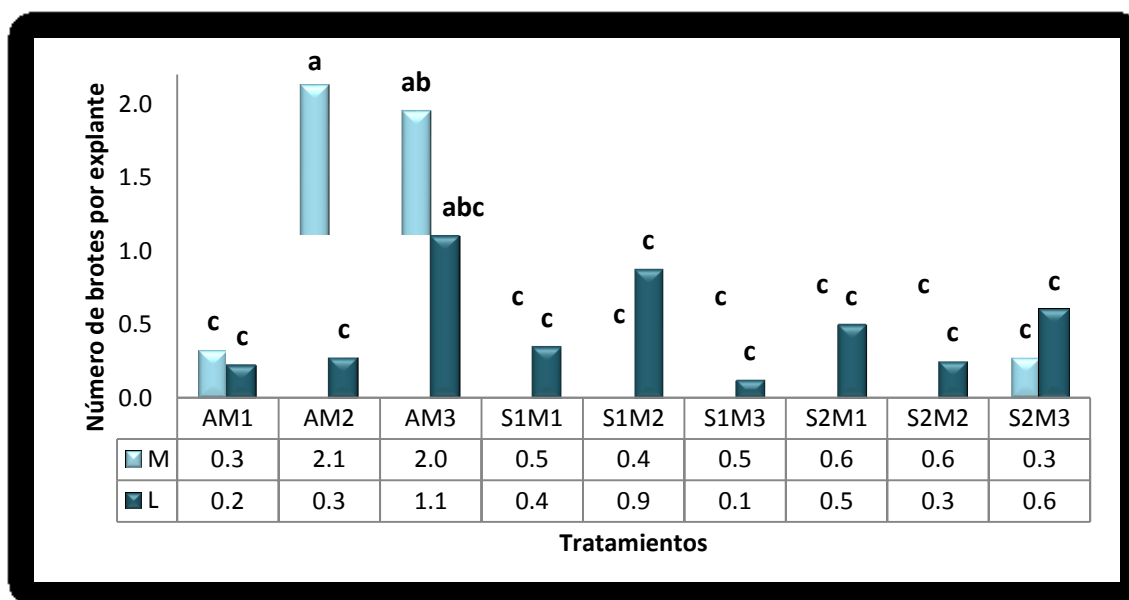


Figura 14. Número de brotes por explante por efecto de la interacción (tratamientos) en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días de cultivo en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). M: Mex 79-431; L: L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); M1: sin reguladores; M2: 0.1 mg L⁻¹ cinetina, 2.0 mg L⁻¹ BAP; M3: 0.5 mg L⁻¹ TDZ.

El hecho de que los valores máximos en ambas variedades, se obtuvieron en los medios M2 y M3 ambos gelificados con agar, podría indicar que el número de brotes normales por explante no fue afectado significativamente por el medio de cultivo, pero si por los sustratos, ya que cuando estos mismos medios se combinaron con cualquiera de los sustratos probados se observó menor respuesta. Por otra parte, la anormalidad (arrocetamiento) que se presentó en los brotes en el medio de cultivo M2, se vio erradicada en combinación con los sustratos.

Explantos que formaron brotes

Efecto de la variedad

En la Figura 15 se observa que 46% de los explantes de la variedad Mex 79-431 formaron brotes adventicios, valor que fue significativamente superior que el mostrado por la variedad L 60-14, es decir, esta variable de respuesta fue afectada por el genotipo. Al respecto, Digonzelli *et al.* (2006) evidenciaron diferencias en cuanto al comportamiento *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar (CP 65-357, LPC 85-384 y CP 48-103) para la brotación de yemas, mostrando mejor brotación la variedad CP 65-357 en condiciones *in vitro* que las otras dos.

La madurez es una característica agronómica en caña de azúcar que se presenta en campo, se sabe que no todas las variedades maduran en la misma época aunque sean influenciadas por los mismos factores, razón por la cual se ha establecido una clasificación de variedades de acuerdo a su madurez (precoz o

temprana, intermedia y tardía). Aunque esta característica agronómica se refiere a una etapa avanzada en el cultivo que no es posible observar *in vitro*, si muestra que existe una respuesta fisiológica dependiente del genotipo. La variedad Mex 79-431 es considerada de madurez media y L 60-14 de madurez temprana (Flores, 2001; Salgado *et al.*, 2013). De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que en condiciones *in vitro* ocurre lo contrario, la variedad Mex 79-431 respondió mejor que la L 60-14.

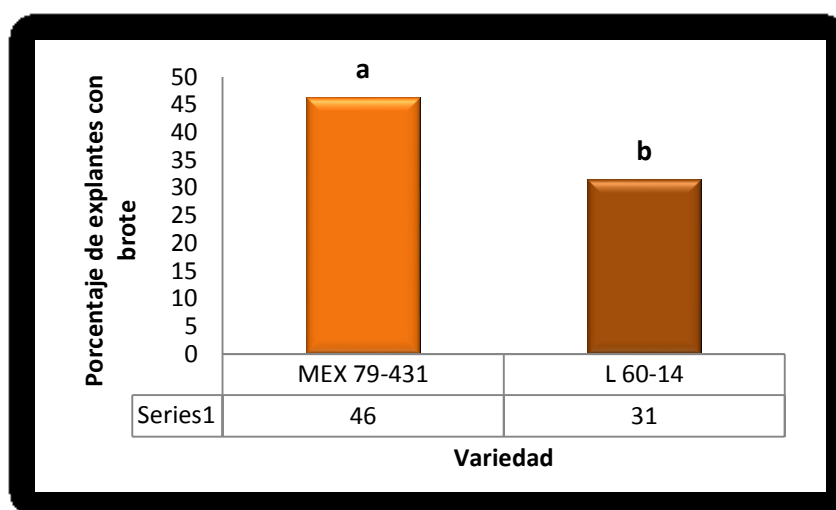


Figura 15. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto de la variedad (Mex 79-431 y L 60-14) en caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Efecto del sustrato

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de explantes que formaron brotes entre los cultivados en vermiculita-perlita de tamaño de partícula

0.25 mm (S2) y aquellos crecidos en agar (A) (Figura 16). En tanto que los explantes cultivados en vermiculita-perlita (0.5 mm) mostraron los valores más bajos.

Es decir que, el tamaño de partícula influyó en esta variable de respuesta. La porosidad determina la capacidad de retención y movimiento del agua que son importantes para el crecimiento de las plantas. Esta propiedad física está relacionada con el tamaño y distribución de partículas (Adler, 1992; Terés *et al.*, 1995). Del tamaño de partícula depende el contacto y proximidad entre ellas, así como la relación agua-aire. La perlita es un material rígido que no se comprime con facilidad, por lo que tiene una buena porosidad y por lo tanto provee de una mejor aireación al sustrato.

Anicua *et al.* (2009) observaron que el mayor porcentaje de porosidad interpartículas (entre partículas) en perlita, se presentó en las de tamaños menores a 0.13 mm y la porosidad intrapartículas (poros en la misma partícula de sustrato) obtuvo el valor más bajo al mismo diámetro de 0.13 mm. De acuerdo a los resultados, el tamaño de partícula 0.25 mm proporcionó un balance más adecuado de agua-aire, así como mayor porosidad intrapartículas que permite una mayor disponibilidad del medio de cultivo para las plantas y por consiguiente una mejor respuesta para la inducción de brotes que un tamaño de 0.5 mm.

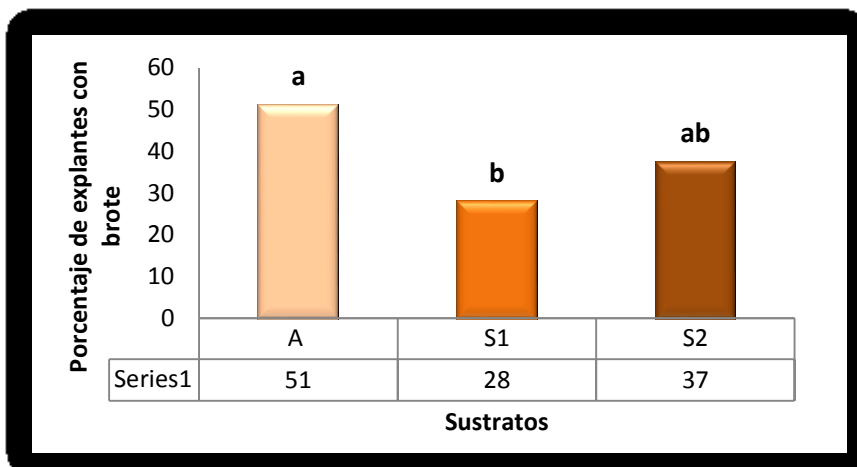


Figura 16. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto del sustrato en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm).

Efecto del medio de cultivo

A diferencia de lo que se observó en la variable número de brotes por explante, no se presentaron diferencias significativas con respecto al porcentaje de explantes que formaron brotes entre los tres medios probados, obteniéndose valores entre 29 y 44% (Figura 17). Lo anterior indica que la presencia de reguladores de crecimiento no tuvo un efecto significativo en esta variable y que ésta también fue independiente del tipo y concentración de estos compuestos en el medio de cultivo.

Valores similares de explantes que formaron brotes se obtuvieron por Karim *et al.* (2002) cuando cultivaron las nervaduras de la hoja de plantas de las variedades Isd- 28 e Isd- 16 de caña de azúcar en medio con 1.0 mg L⁻¹ de cinetina (42 y 45 %), o 1.0 mg L⁻¹ de BAP (60 y 75%). Pero, los valores más altos de explantes con brotes se lograron con la combinación de 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de AIB (92 y 100 %). Dado lo anterior, se infiere un efecto sinérgico entre auxina y citocinina para promover un mayor porcentaje de explantes que formaron brotes.

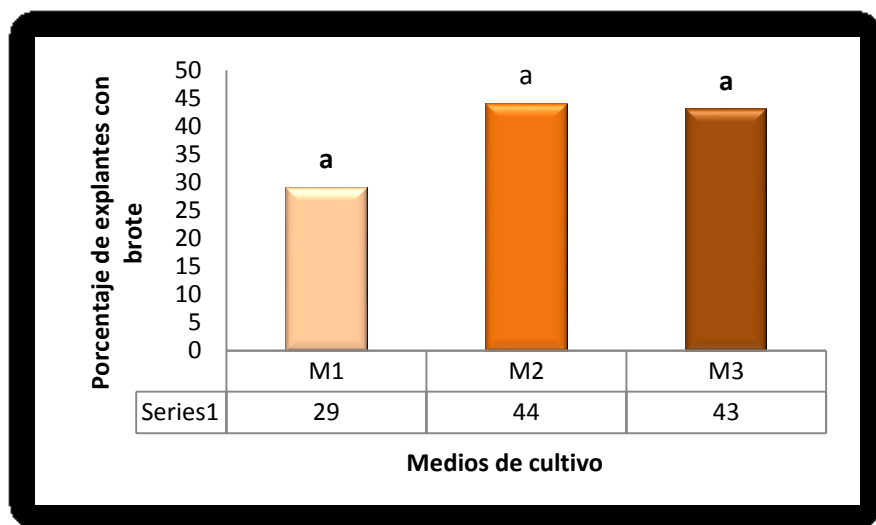


Figura 17. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto del medio de cultivo en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). M1: sin reguladores; M2: 0.1 mg L⁻¹ cinetina, 2.0 mg L⁻¹ BAP; M3: 0.5 mg L⁻¹ TDZ.

Efecto de la interacción entre variedad, medio de cultivo y sustrato

(Tratamientos).

Sólo fue posible encontrar diferencias significativas en el porcentaje de explantes que formaron brotes entre aquellos de la variedad Mex 79-431, crecidos en el medio M3 (0.5 mg L⁻¹ TDZ) gelificado con agar (92%) y los explantes de la variedad L 60-14 cultivados en el medio M3 y vermiculita-perlita (0.5 mm) (S1) (8%) (Figura 18).

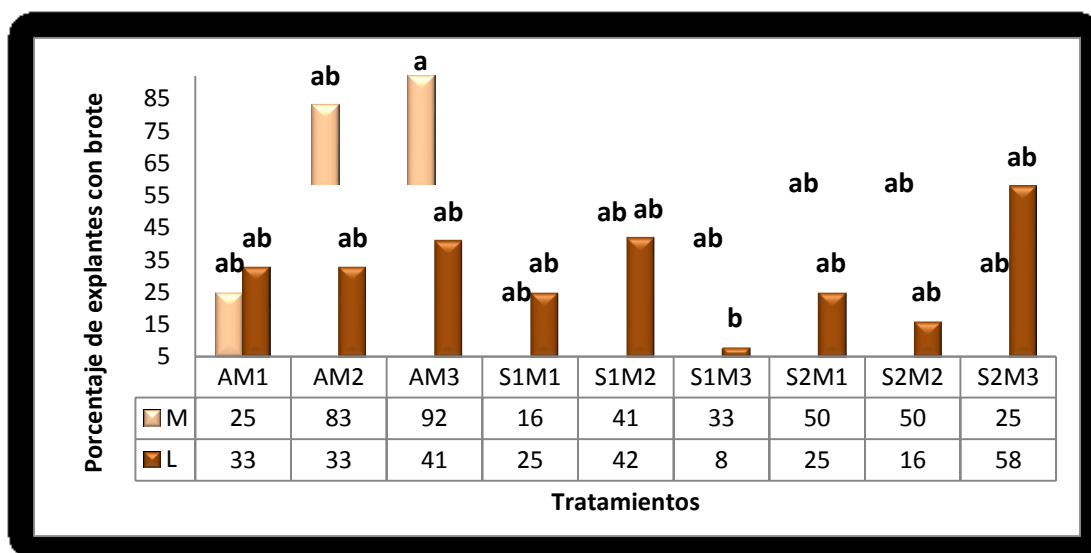


Figura 18. Porcentaje de explantes que formaron brote por efecto de la interacción (tratamientos) en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). M: Mex 79-431; L: L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); M1: sin reguladores; M2: 0.1 mg L⁻¹ cinetina, 2.0 mg L⁻¹ BAP; M3: 0.5 mg L⁻¹ TDZ.

El hecho de que en este mismo medio y sustrato, un mayor número de explantes de la variedad Mex 79-431 formaran brotes, indica la influencia del genotipo en la respuesta.

Experimento 2. Enraizamiento

Supervivencia

Efecto de la variedad

Los resultados obtenidos en la presente investigación no mostraron diferencias significativas entre las dos variedades estudiadas con respecto a la supervivencia durante el enraizamiento. Los valores para esta variable oscilaron entre el 85 y 86 % (Figura 19).

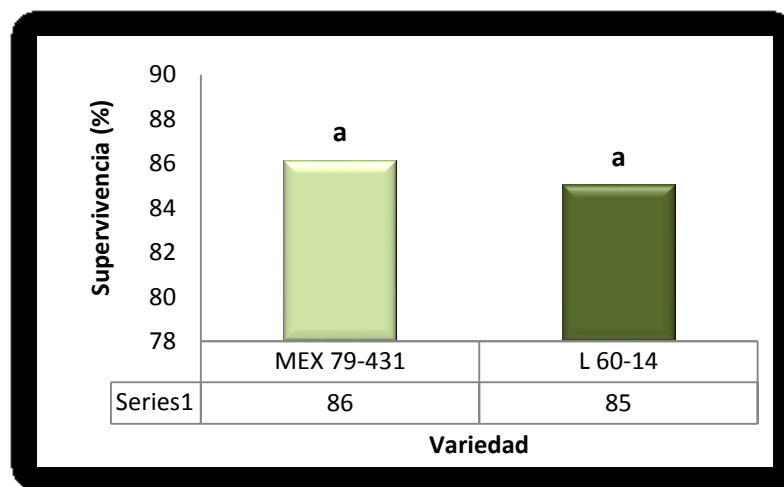


Figura 19. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la variedad (Mex 79-431 y L 60-14) en caña de azúcar cultivados durante 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Efecto del sustrato

No se encontraron diferencias estadísticas en la supervivencia de los brotes cultivados en los sustratos y el agar (Figura 20). Lo anterior significa que ambos sustratos pueden utilizarse como sustitutos del agar permitiendo que una alta proporción de brotes adventicios sobrevivan. Asimismo, poder utilizar sustratos como soporte durante el enraizamiento puede reducir los costos. Díaz *et al.* (2004) mencionan que la aireación del suelo (en este caso de los sustratos) favorece la máxima absorción de elementos esenciales (N, P, K, Ca, Mg, Cl, B, Zn, Cu, Fe y Mn) para el crecimiento y por lo tanto supervivencia de las plántulas.

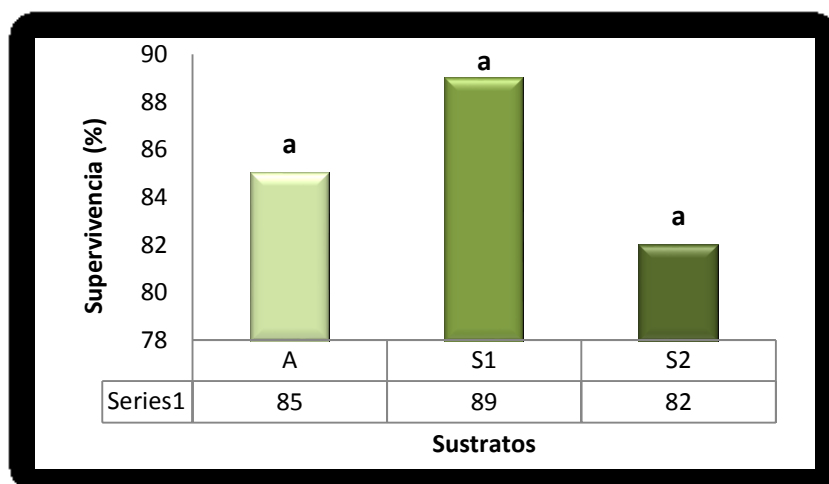


Figura 20. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto del sustrato en dos variedades de caña de azúcar cultivados durante 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm).

Efecto del medio de cultivo

La supervivencia de los explantes cultivados en un medio con AIB (R2) no fue significativamente mayor que la de aquellos cultivados en un medio carente de este (R1); es decir, la supervivencia no está determinada por la presencia de auxinas en el medio (Figura 21).

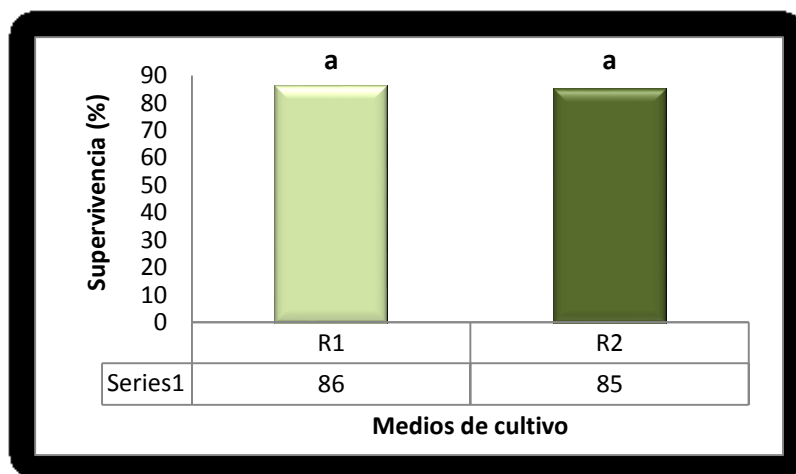


Figura 21. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo en dos variedades de caña de azúcar cultivados durante 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). R1: sin reguladores; R2: 1 mg L⁻¹ AIB.

Efecto de la interacción entre variedad, medio de cultivo y sustrato (Tratamientos).

El análisis de los resultados no permitió encontrar diferencias estadísticas para esta variable entre los distintos tratamientos probados (Figura 22). Lo anterior significa

que la supervivencia de los explantes no estuvo en función de la variedad, del medio (AIB), ni del sustrato.

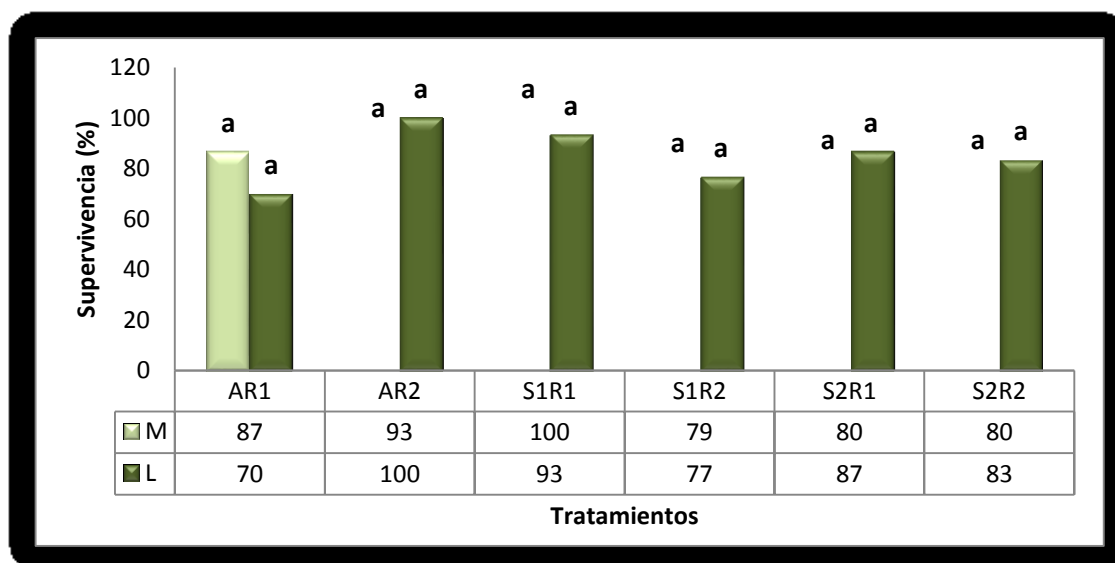


Figura 22. Porcentaje de supervivencia de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamientos) en dos variedades de caña de azúcar cultivadas durante 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) M: Mex 79-431; L: L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: sin reguladores; R2: 1 mg L⁻¹ AIB.

Porcentaje de enraizamiento

Efecto de la variedad

El crecimiento y desarrollo de las plantas depende en gran medida de su sistema radical (Salgado-García *et al.*, 2013), las raíces se encargan de la absorción y transporte de agua y sales minerales que obtienen del suelo. Asimismo,

proporcionan anclaje y pueden almacenar materiales de reserva (Subirós, 2000). En caña de azúcar el 80% de las raíces se encuentra cerca de la superficie (Villegas, 2010).

El porcentaje de enraizamiento de la variedad L 60-14 fue significativamente mayor (94%) que el de la variedad Mex 79-431 (Figura 23); es decir, la capacidad de enraizamiento de los brotes estuvo influenciado por la variedad. Se han observado diferencias en cuanto al desarrollo radical entre variedades (Valdez y Rodríguez, 1981).

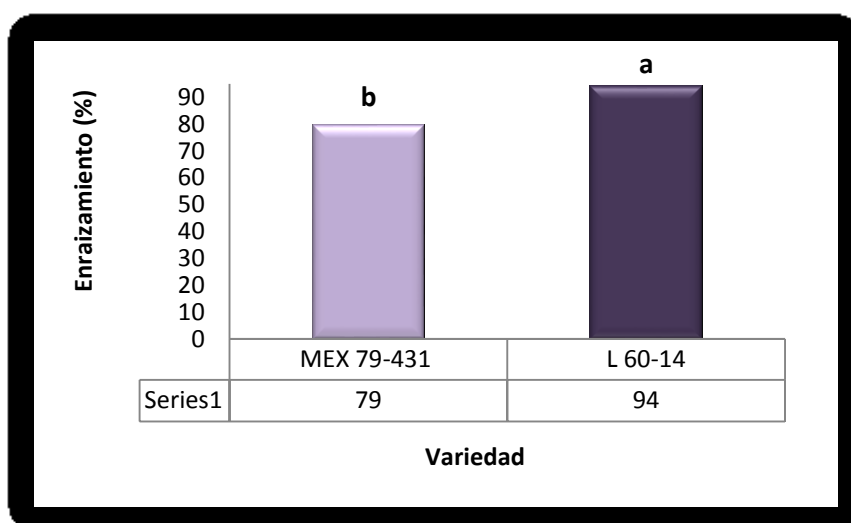


Figura 23. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto de la variedad (Mex 79-431 y L 60-14) en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Asimismo, Sabaz *et al.* (2009) encontraron diferencias en la capacidad para formar raíces en los brotes de tres variedades de caña (HSF-240, CP-77-400 y CPF-237). En contraste, Karim *et al.* (2002) no observaron diferencias significativas en la capacidad de enraizamiento de las variedades Isd-28 y Isd-16 de caña de azúcar.

Efecto del sustrato

No se encontraron diferencias estadísticas en el enraizamiento de los brotes cultivados en agar y los dos sustratos probados (S1 y S2) (Figura 24). Lo anterior, indica que el uso de sustratos como sustituto del agar en el medio de cultivo, permite la formación del sistema radical de forma tan eficiente como el agar. Al respecto, García y Medina (2010) observaron que la proliferación de raíces en caña de azúcar es más abundante cuando se presenta buena disponibilidad de agua y aireación en el suelo.

Asimismo, se ha observado que las mezclas entre sustratos (Labrousse *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2004; Newell *et al.*, 2003) y sustratos con agar (Jay- Allemand *et al.*, 1992) mejoran las condiciones donde se desarrolla el sistema radical. Sin embargo, en manzano (*Malus prunifolia*) el tamaño de partícula del sustrato influyó en el enraizamiento; siendo mejor cuando el tamaño de la partícula es menor (Mohan *et al.*, 2004).

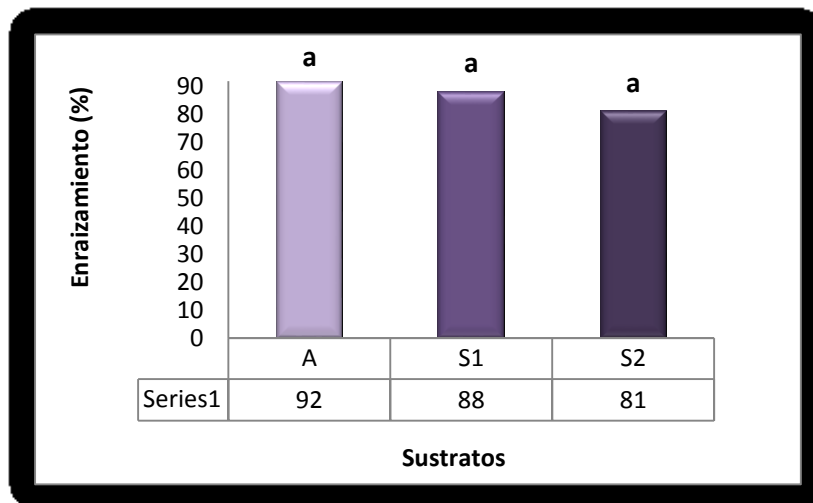


Figura 24. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto del sustrato en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm), S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm).

Efecto del medio de cultivo

La capacidad de enraizamiento de los brotes adventicios cultivados en un medio suplementado con AIB (R2) no fue significativamente mejor que de aquellos enraizados en uno carente de esta auxina (R1) (Figura 25). Esto quiere decir, que la concentración endógena de auxinas en los brotes fue suficiente para permitir la formación de raíces, aun cuando no hubiera AIB en el medio de cultivo. Estos resultados coinciden con los de Puente (1996) quien no observó diferencias significativas en el porcentaje de enraizamiento de brotes de manzano (*Malus domestica*) cuando agregó AIB al medio y cuando el medio carecía de éste.

Asimismo, las yemas axilares de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) enraizaron en un 100% y mostraron la mayor longitud de la raíz en un medio sin reguladores de crecimiento) (Saucedo *et al.*, 2008).

En contraste, Martínez-Hernández encontraron que la formación de raíces en patrones de cítricos (*Citrus volkameriana*, *Citrus swingle* y C-35) se dio por la adición de reguladores de crecimiento. Asimismo, Karim *et al.* (2002) observaron el máximo porcentaje de enraizamiento de brotes de dos variedades de caña de azúcar (Isd-16, Isd-28), al adicionar 3 mg L⁻¹ ANA al medio.

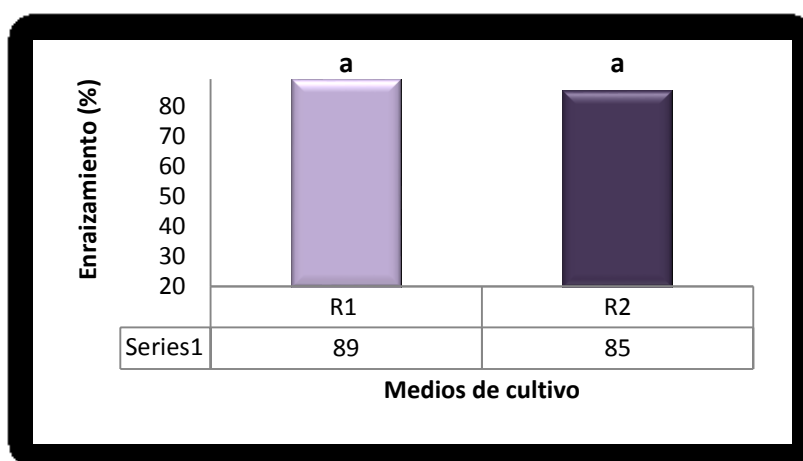


Figura 25. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). R1: MS sin reguladores; R2: MS, 1 mg L⁻¹ AIB.

Efecto de la interacción variedad, medio de cultivo y sustrato (Tratamientos).

Sólo los brotes del tratamiento MS1R2 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.5 mm, medio R2) mostraron un porcentaje de enraizamiento significativamente inferior al de los tratamientos L-AR1 (L 60-14, agar, medio R1), L-AR2 (L 60-14, agar, medio R2) L-S1R2 (L 60-14, vermiculita-perlita 0.5 mm, medio R2), L-S2R2 (L 60-14, vermiculita 0.25 mm, medio R2) (Figura 26). Estos resultados indican que tanto los brotes de la variedad L 60-14 como la Mex 79-431 pueden formar raíces con la misma eficiencia que en agar, como con vermiculita-perlita (de ambos tamaños de partícula), y en presencia o ausencia de AIB. Lo anterior, tendría una repercusión directa en la reducción de los costos de producción.

Dado que los brotes de la variedad Mex 79-431 cultivados en vermiculita-perlita (0.5 mm) y el medio con AIB mostraron los valores de enraizamiento más bajos (57%), no es recomendable utilizar estas condiciones de cultivo para el enraizamiento de los brotes de esta variedad.

En un estudio realizado en *Mentha citrata* y *Menta piperita* se observaron diferencias entre adicionar o no reguladores de crecimiento en los medios de enraizamiento y entre especies (Godoy *et al.*, 2005). Lo anterior indica que, de acuerdo a la especie o variedad, y a determinadas combinaciones de reguladores de crecimiento se puede potencializar el desarrollo de las raíces.

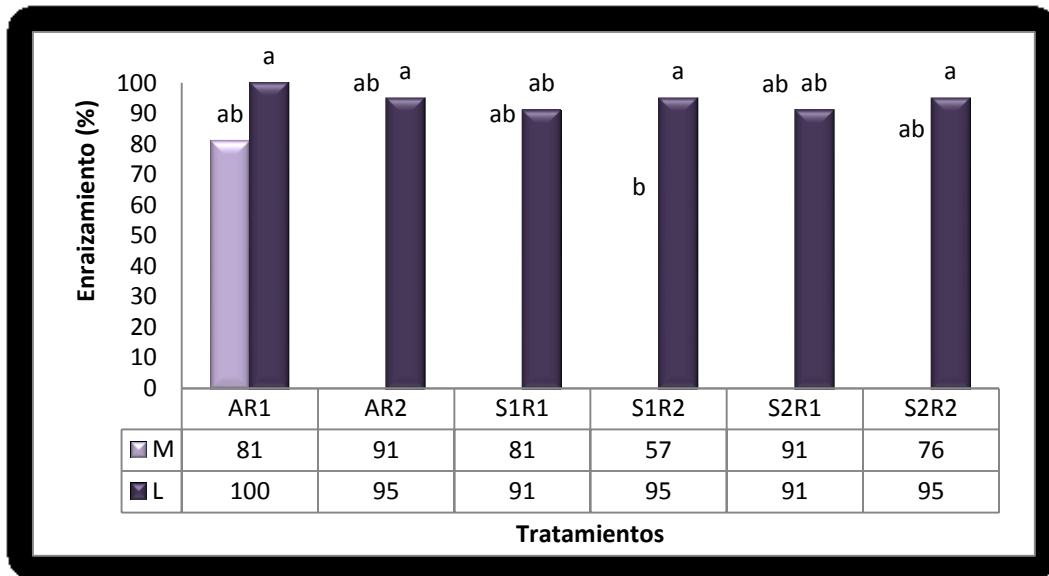


Figura 26. Porcentaje de enraizamiento de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamientos) en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) M: Mex 79-431; L: L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: sin reguladores; R2: 1 mg L⁻¹ AIB.

Raíces secundarias

Efecto de la variedad

Fue posible observar diferencias significativas en cuanto a la formación de raíces secundarias entre las variedades estudiadas, siendo L 60-14 la que formó un mayor número de ellas (5.3) (Figura 27).

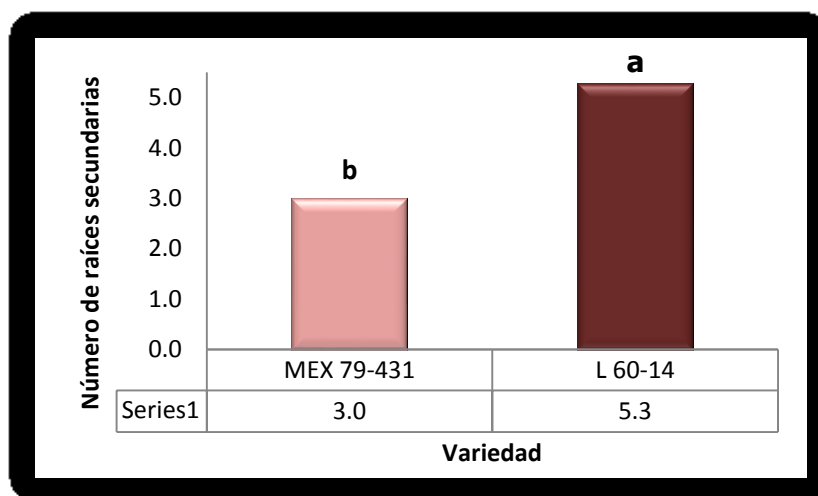


Figura 27. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto de la variedad (Mex 79-431 y L 60-14) en caña de azúcar después de 30 días de ser cultivados en distintos medios y sustratos.

Subirós (2000) y Flores (2001) afirman que la variedad cultivada es un factor importante que determina la capacidad de exploración del sistema radical en el suelo; es decir, cada variedad tiene distinta habilidad para generar raíces. Por su parte, Sánchez (1972) menciona que la tolerancia de algunas variedades a la sequía, puede estar relacionada con su habilidad para producir una alta proporción de pelos absorbentes dentro de la masa de su sistema radical. Un estudio sobre la distribución del sistema radical en cinco variedades (B80-549, CR74-250, V71-39, B80-408 Y PR61-632) de caña de azúcar, mostró que existen diferencias entre el número y distribución de raíces, destacándose B80-549, PR61-632 y CR74-250 por presentar el mayor número de raíces gruesas y medianas con respecto a las otras dos variedades probadas (Bastidas *et al.*, 2011). La salinidad es otro factor que afecta la acumulación de masa radical, García y Medina (2010) observaron que el

promedio de biomasa de raíces de caña de azúcar fue mayor en la variedad PR692176 (más tolerante a la salinidad) que en V78-1 con menos tolerancia.

Efecto del sustrato

No se encontraron diferencias significativas para esta variable entre los brotes crecidos en agar y aquellos cultivados en vermiculita-perlita de tamaño 0.25 mm (S2), obteniéndose hasta 5.3 raíces por brotes. No obstante, estas condiciones de cultivo si promovieron un mayor número de raíces que la vermiculita-perlita con tamaño de partícula de 0.5 mm (S1) (1.9%) (Figura 28).

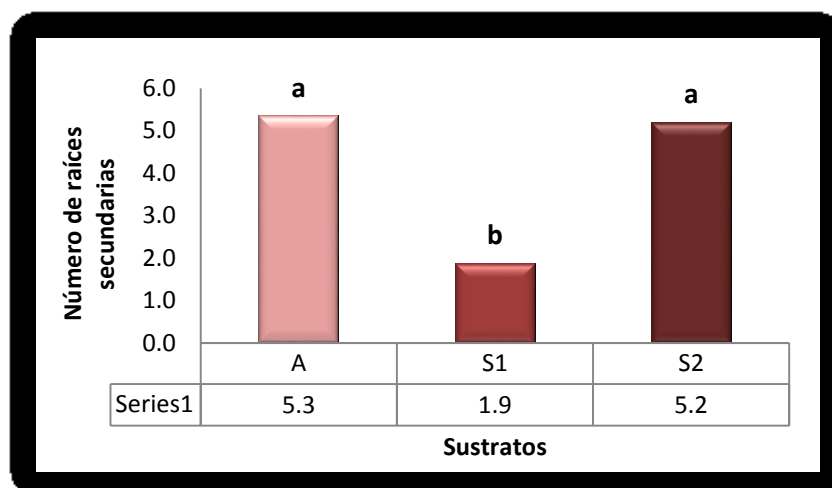


Figura 28. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto del sustrato en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm), S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Jimarez (2014) en donde el número de raíces formadas fue similar en los brotes de chile habanero (*Capsicum chinense*) cultivados en sustratos o agar.

La textura y compactación del sustrato son factores que pueden representar una barrera física para el desarrollo de la raíz. Así como también, la oxigenación de las raíces (Subirós, 2000) y la disponibilidad de los nutrimentos (Villegas, 2010).

Cuando no existe una adecuada oxigenación de las raíces, se limitan sus funciones metabólicas, y la densidad así como la penetración de las raíces es poca (Subirós, 2000). Se esperaría que en la vermiculita-perlita con mayor tamaño de partícula (S1), hubiera una mejor oxigenación que con un menor tamaño de partícula (S2); sin embargo, al incrementar la porosidad, hay menos superficie de contacto de las raíces con el medio y por lo tanto, la disponibilidad de los nutrimentos es más limitada. Es sumamente importante para el desarrollo radical, considerar el movimiento de los nutrimentos en la interfase suelo-raíz (flujo de masas o difusión) y la exudación de sustancias que produce la raíz y que disuelve los nutrientes de la rizósfera del suelo (Villegas, 2010).

Asimismo, es interesante resaltar que aunque no se presentaron diferencias en el porcentaje de enraizamiento entre S2 y agar (Figura 24), si se presentaron diferencias a nivel morfológico en la raíz. Los brotes que fueron enraizados en

sustratos, presentaron raíces más gruesas, mientras que las de los brotes enraizados en agar fueron más largas y delgadas (Figura 29).

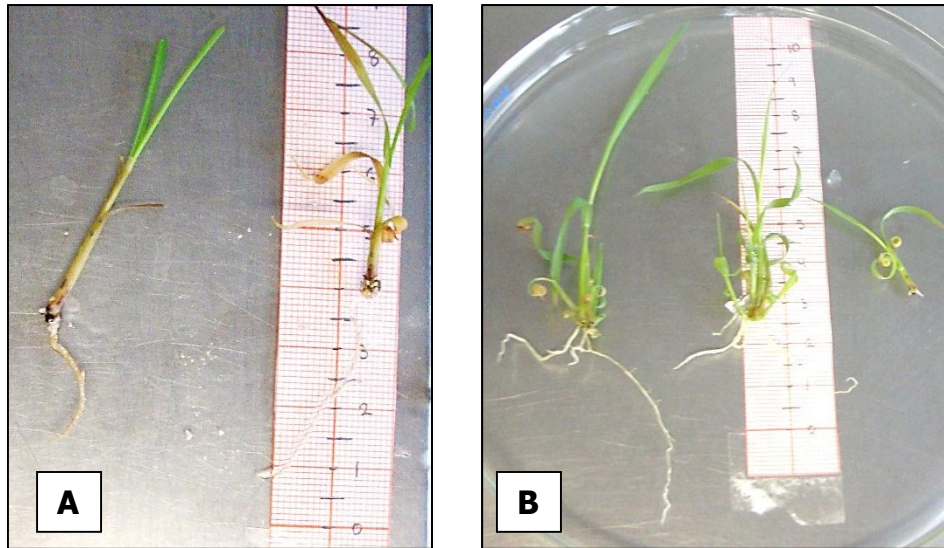


Figura 29. Comparación entre raíces de plántulas de caña de azúcar crecidas en sustrato (A) y agar (B).

Ciertamente el acomodo celular es distinto en cada caso, las células de la epidermis poseen un menor nivel de organización en el agar que en sustratos. Las raíces desarrolladas en agar requieran aumentar su área de exploración para disponer de los nutrimentos que se encuentran fuertemente retenidos por el agar. Caso contrario en los sustratos, en donde la porosidad brinda un balance entre agua y aire que permite una mayor disponibilidad de los nutrimentos del medio y menor necesidad de exploración de la raíz. Se ha reportado que la vermiculita promueve un balance entre la aireación y humedad favoreciendo también la

penetración de las raíces a diferencia del agar (Jay-Allemand *et al.*, 1992; Dethier, 1993).

Efecto del medio de cultivo

En este estudio la formación de raíces secundarias se redujo significativamente cuando se incluyó AIB al medio de cultivo (medio R2) (Figura 30). Esto podría indicar que la adición de una auxina no es necesaria para que se formen raíces secundarias en las variedades usadas o bien que la concentración utilizada no fue la óptima para promover dicha respuesta. Estos resultados coinciden con lo observado por Godoy *et al.* (2005) quienes encontraron que la cantidad de raíces generadas en *Mentha citrata* no fue diferente en presencia o ausencia de auxinas. Del mismo modo, en *Agave inaequidens* se obtuvieron mejores resultados en el número y longitud de raíces en los brotes cultivados en medios sin reguladores de crecimiento (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008).

Las auxinas muestran efectos en la formación de raíces adventicias, el AIB es la auxina más utilizada en medios de enraizamiento, y a pesar de ello algunos autores no encontraron diferencias significativas en la formación de raíces por efecto de la aplicación de este regulador en distintas especies del género *Bursera* y *Prosopis alba* (Bonfil-Sanders *et al.*, 2007; Oberschelp y Marco, 2010).

En contraste, Karim *et al.* (2002) obtuvieron el mayor número de raíces por brote en las variedades Isd-16 e Isd-28 (10 y 11, respectivamente) cuando incluyeron en el medio 3 mg L⁻¹ de AIB.

Kumar y Sahoo en (2009) encontraron que los brotes de *Saccharum officinarum* variedad Nayana cultivados en presencia de 2.5 mg L⁻¹ de AIB formaron hasta 10.5 raíces en promedio. Por otro lado, Baksha *et al.*, 2002 obtuvieron 12 raíces por brote utilizando 5 mg L⁻¹ de AIB en la variedad Isd-28.

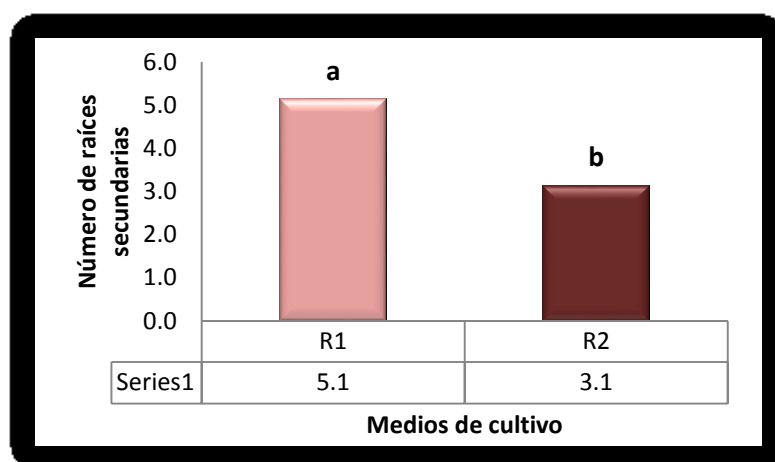


Figura 30. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días de ser cultivados en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). R1: MS sin reguladores; R2: Ms, 1 mg L⁻¹ AIB.

Efecto de la interacción variedad, medio de cultivo y sustrato

(Tratamientos)

Los brotes de los tratamientos L-AR1, M-AR2, L-AR2, M-S2R1 y L-S2R1, formaron un número de raíces secundarias estadísticamente igual. Únicamente los brotes de los tratamientos M-AR1, M-S1R1, L-S1R1, M-S1R2, L-S1R2, M-S2R2, L-S2R2 formaron un número de raíces secundarias estadísticamente inferior al de los brotes de los tratamientos L-AR1 (L 60-14, agar, medio R1) y L-S2R1 (L 60-14, vermiculita-perlita 0.25 mm, medio R1) (9.0 y 9.3, respectivamente) (Figura 31). Es evidente la influencia de la interacción variedad y sustrato sobre el número de raíces secundarias, ya que solo L 60-14 mostró los valores más altos logrando que uno de los sustratos (S2) se comportará del mismo modo que en agar.

La formación de raíces secundarias fue menor en los medios adicionados con un regulador de crecimiento (R2) que con los que no lo contenían (R1), excepto en M-AR2 donde si aumento 1.7 raíces en promedio en presencia de AIB, lo que evidencia el efecto de la interacción variedad x medio.

Trabajos como los de Jay-Allemand *et al.* (1992) muestran el efecto de la interacción de sustrato y medio. Estos autores observaron en seis clones de nogal (D152, G1, MR8, MR9, HA3-1 y HA2-13) que al utilizar una mezcla de vermiculita con medio gelificado, cinco de los seis clones formaron raíces secundarias en

diferentes proporciones, mientras que los brotes de los tratamientos en donde no se adicionó vermiculita no se formaron raíces secundarias.

En caña de azúcar, Kumar *et al.* (2009) encontraron que el tipo auxina, la concentración y combinación de éstas, así como el tipo de explante utilizado, juegan un papel importante en la formación de raíces.

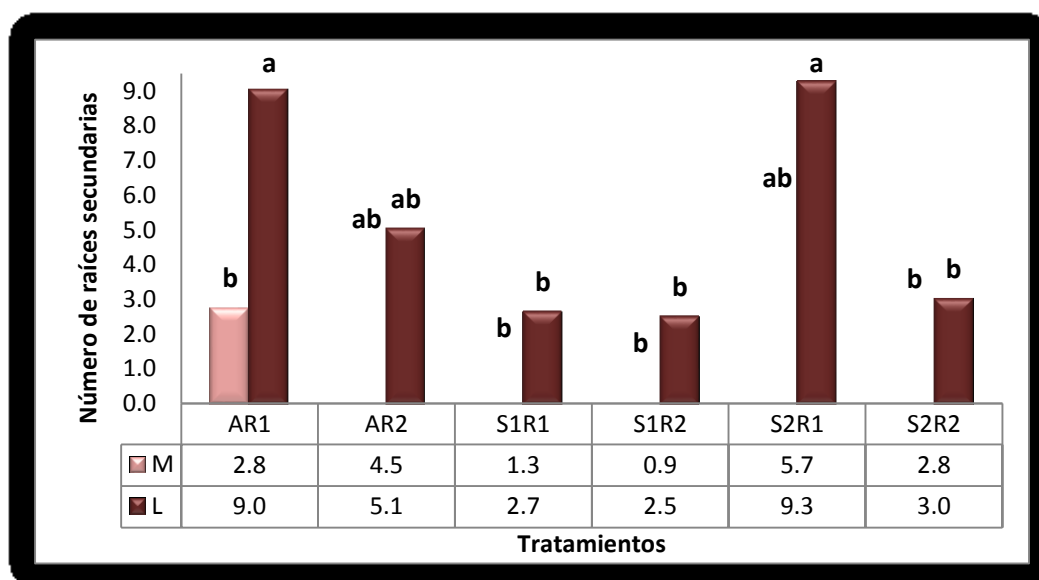


Figura 31. Número de raíces secundarias de los brotes adventicios por efecto de la interacción (tratamientos) en dos variedades de caña de azúcar después de 30 días de ser cultivados en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). M: Mex 79-431; L: L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: sin reguladores; R2: 1 mg L⁻¹ AIB.

Longitud de la raíz principal

Efecto de la variedad

No se encontraron diferencias significativas en la longitud de la raíz principal formada en los brotes de ambas variedades (1.5 cm) (Figura 32). Lo que indica que esta variable, no es afectada directamente por el genotipo en condiciones *in vitro*. Lo anterior evidencia que la diferencia en la formación del sistema radical de estas dos variedades se dirige a las raíces secundarias y no en la principal.

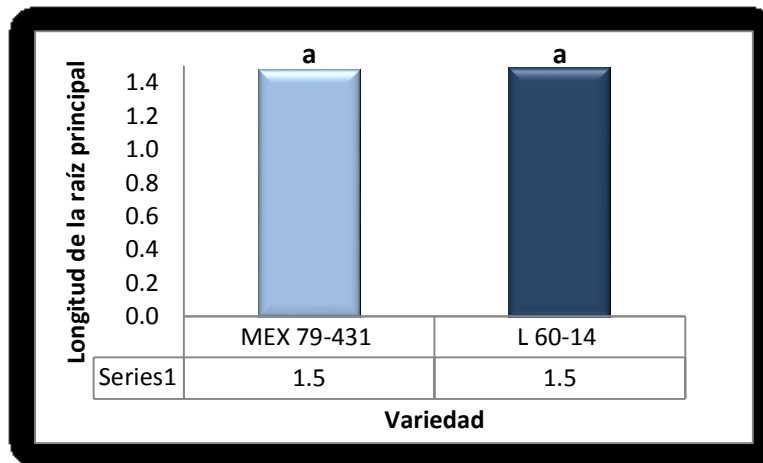


Figura 32. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios por efecto de la variedad (Mex 79-431 y L 60-14) en caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Karim *et al.* (2002) obtuvieron valores semejantes en la longitud de la raíz, en las variedades Isd-28 e Isd-16 (3.4 y 3.8 cm). Asimismo, Amaya *et al.* (1995) mencionan que algunas características como la densidad y longitud de la raíz

dependen de la variedad, así como de otros factores ambientales como el tipo de suelo y la humedad. Se sabe que las variedades con sistema radical más profundo y denso pueden sufrir menos daño.

Efecto del sustrato

En la Figura 33 se observa que la longitud máxima de la raíz principal se presentó en los brotes crecidos en agar (2.3 cm), en tanto que no hubo diferencias estadísticas en la longitud de la raíz principal de los brotes crecidos en los sustratos S1 y S2 (vermiculita-perlita con tamaño de partícula 0.5 y 0.25 mm, respectivamente). Es conocido que mayor porosidad y oxigenación mejora el desarrollo de las raíces Newell *et al.*, (2003). Sin embargo, en este caso es posible que al incrementarse el espacio poroso en el ambiente del sistema radical, sea más difícil entrar en contacto con los nutrientes y se vea limitado su aprovechamiento por parte de la planta; o bien, no todos los nutrientes (principalmente los micronutrientes) estén fácilmente disponibles en los sustratos como en agar.

Contrario a los resultados obtenidos en este estudio, Dethier (1993) y Jay-Allemand (1992) encontraron que el uso de vermiculita *in vitro* fue favorable para el número de raíces por explante y longitud de la raíz en brotes adventicios de *Haworthia* y en el porcentaje de enraizamiento, número de raíces primarias y secundarias en plántulas regeneradas a partir de embriones de seis híbridos (D152, G1, MR8, MR9, HA3-1, HA2-13) de nogal, que el agar.

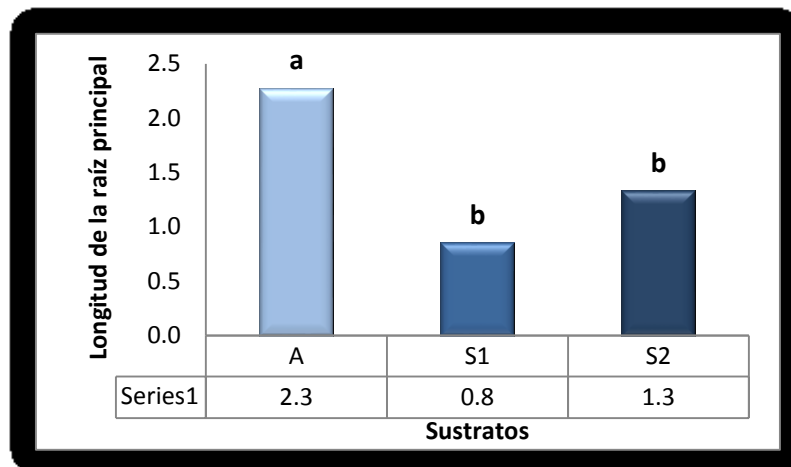


Figura 33. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios por efecto del sustrato en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm).

Efecto del medio

La mayor longitud de la raíz principal se observó en los brotes cultivados en un medio sin AIB (1.9 cm) (R1) (Figura 34). Esto indica que el AIB en el medio de cultivo a la concentración probada redujo la longitud de la raíz.

Para caña de azúcar se ha reportado raíces con una longitud hasta de 3.8 cm para los brotes de las variedades Isd-28 e Isd-16, cuando son cultivados con 3 mg L^{-1} (Karim *et al.*, 2002 y Baksha *et al.*, 2002). Kumar *et al.* (2009) también encontraron raíces de hasta 4 cm cuando cultivaron brotes de *Saccharum*

officinarum variedad Nayana en 2.5 mg L⁻¹ ANA. Es decir, que el tipo de regulador de crecimiento y la concentración del mismo puede influir en la longitud de la raíz. Con base en estudios anteriores donde se ha utilizado AIB, se sabe que la adición de concentraciones intermedias que oscilan entre los 2.5 y 5 mg L⁻¹, logra mejores resultados que las concentraciones más altas o bajas (7 y 0.5 mg L⁻¹). Por lo tanto, es recomendable no adicionar el regulador de crecimiento o bien, elegir una dosis moderada y reducir a la mitad la concentración de las sales basales de MS para potencializar la longitud de la raíz principal.

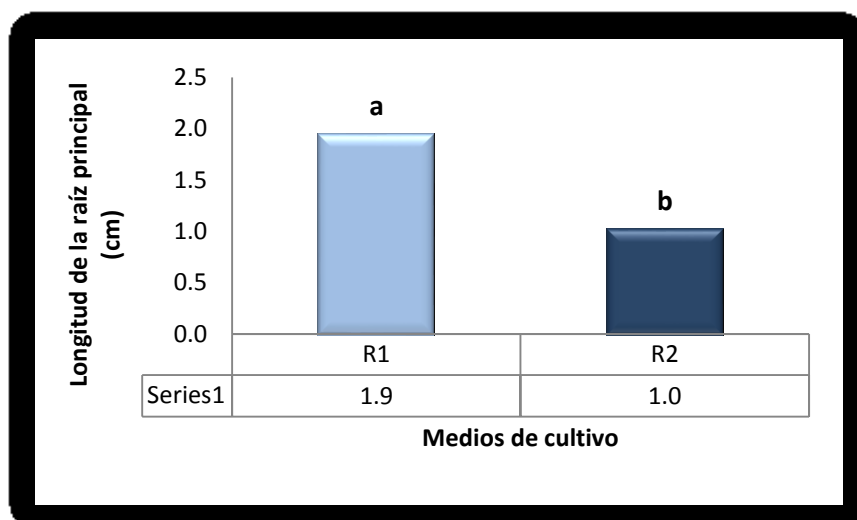


Figura 34. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios por efecto del medio de cultivo en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). R1: MS, sin reguladores; R2: MS, 1 mg L⁻¹ AIB.

Efecto de la interacción variedad, medio de cultivo y sustratos (Tratamientos).

Únicamente los brotes provenientes de los tratamientos M-S1R2 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.5 mm, medio con AIB), L-S1R2 (L 60-14, vermiculita-perlita 0.5 mm, medio con AIB) M-S2R2 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.25 mm, medio con AIB) y L-S2R2 (L 60-14, vermiculita-perlita 0.25 mm, medio con AIB) formaron raíces con una longitud inferior a la de los tratamientos M-AR1 (Mex 79-431, agar, medio sin AIB) y L-AR1 (L 60-14, agar, medio sin AIB) (Figura 35).

Como puede observarse en los tratamientos con los valores más bajos, una constante fue el uso de vermiculita-perlita y medio con AIB. Asimismo, la longitud de la raíz de los brotes de la variedad L60-14 cultivados en vermiculita-perlita con tamaño de partícula de 0.5 mm (S1) y AIB (L-S1R2) fue estadísticamente igual que la de aquellos provenientes de los tratamientos (L-AR2, M-AR2).

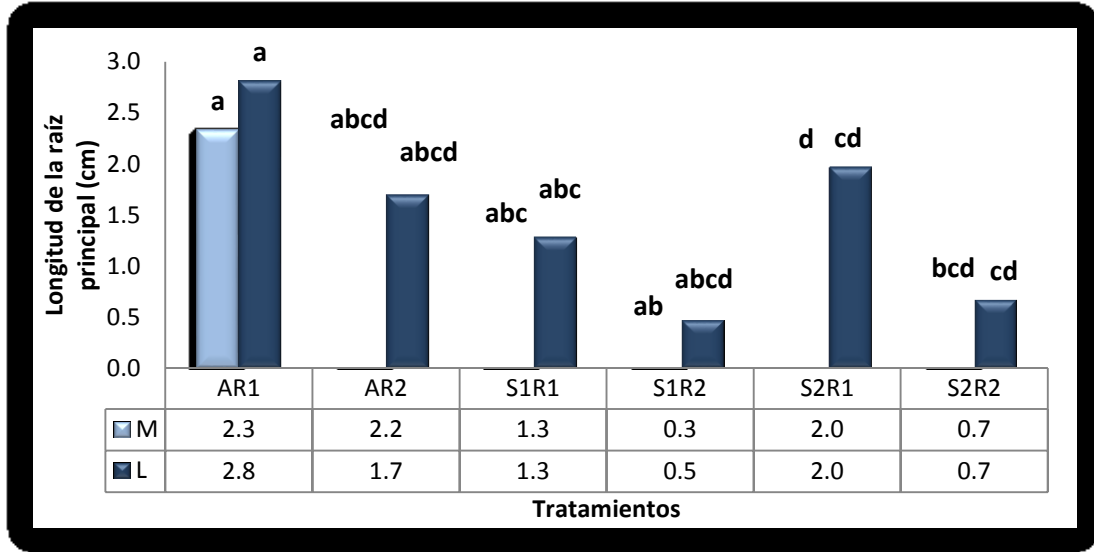


Figura 35. Longitud de la raíz principal de los brotes adventicios formados por efecto de la interacción (tratamientos) en dos variedades de caña de azúcar cultivados después de 30 días en distintos medios y sustratos. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) M: Mex 79-431; L: L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: MS sin reguladores; R2: MS, 1 mg L⁻¹ AIB.

Aclimatación

Supervivencia

Efecto de los tratamientos

Las plantas regeneradas por cultivo de tejidos sufren cambios morfológicos y fisiológicos debido a las condiciones que predominan en el cultivo *in vitro*. Dichos cambios dificultan su adaptación en el invernadero o campo. La aclimatación

permite que la planta alcance un crecimiento autotrófico en un ambiente de menor humedad relativa, mayor temperatura e intensidad lumínica (Díaz *et al.*, 2004). Esta etapa es fundamental para la micropropagación dado que las fallas durante esta fase ponen en peligro la supervivencia de las plantas. Debido a problemas de contaminación, las plantas de los tratamientos M-S2R2 y L-S1R2 murieron antes de llegar a la etapa de aclimatación, por lo que no se tienen datos de su comportamiento durante esta fase.

En la Figura 36 se observa que en la mayoría de los tratamientos la supervivencia de las plantas estuvo por arriba de 80%. Sólo las plantas del tratamiento M-S1R2 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.5 mm, medio con AIB) mostró valores de supervivencia menores a las plantas de los tratamientos L-AR1, L-AR2, M-AR1 y M-AR2 que se habían cultivado en medios con agar.

Existen estudios acerca de la utilización de sustratos y combinaciones de ellos para la fase de aclimatación en varias especies. Al respecto, plantas de *Harwothia* micropropagadas en vermiculita y medio MS líquido mostraron altos porcentajes de supervivencia (92%) en condiciones de invernadero (Dethier, 1993). Asimismo, plántulas de papa dulce (*Ipomea batatas*) crecidas *in vitro* en pulpa de papel y vermiculita (30:70) tuvieron una supervivencia de 100% al transferirse a condiciones de invernadero. Dicha respuesta se atribuyó al balance en la porosidad

del sustrato, ya que sólo 73% de las plantas cultivadas en agar sobrevivieron (Afrren-Zobayed *et al.*, 2000).

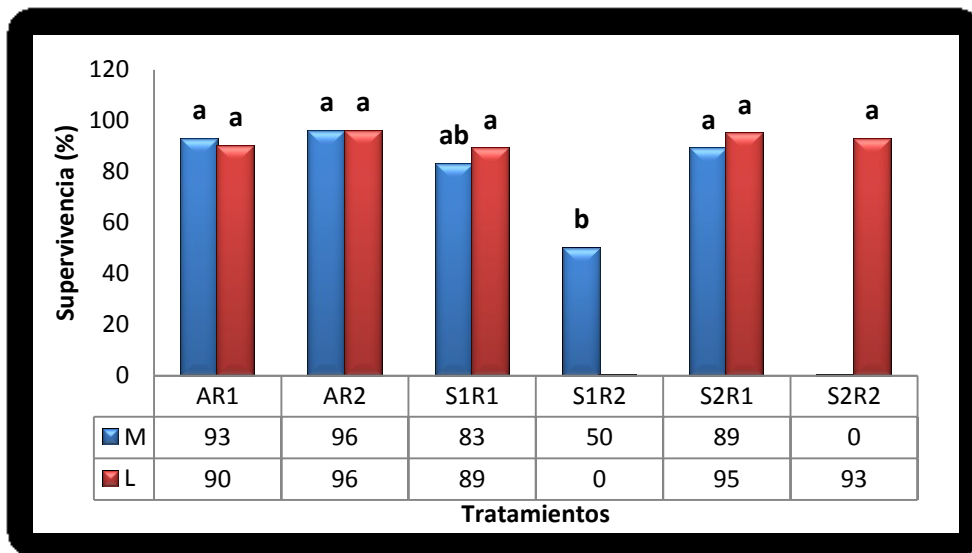


Figura 36. Supervivencia de las plantas regeneradas en diferentes tratamientos después de 30 días de permanecer en el invernadero. Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). M: variedad Mex 79-431; L: variedad L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: MS sin reguladores; R2: MS, 1 mg L⁻¹ AIB.

Las vitroplantas de tres patrones de cítricos (*Citrus volkameriana*, *Citrus swingle*, C-35) regeneradas *in vitro* sobre perlita, vermiculita y tezontle al 100% mostraron porcentajes de supervivencia entre 91 y 100%, mientras que la obtenidas en agar sólo 48-50% de ellas sobrevivieron (Martínez-Hernández *et al.*, 2006).

El hecho de que las plantas de caña de azúcar enraizadas (*in vitro*) en sustratos mostraran valores de supervivencia similares a los de aquellas que se enraizaron en agar, indica que los sustratos pueden sustituir al agar durante esta fase, con una consecuente reducción de costos.

Número de hojas

Efecto de los tratamientos

Las hojas son los principales órganos fotosintéticos (proceso por el cual la energía lumínica se transforma en energía química (ATP) traduciéndose en un mejor desarrollo de la planta. En el Cuadro 5 se puede observar que no hubo diferencias estadísticas en el número de hojas que formaron las plantas obtenidas en los distintos tratamientos probados, después de 12 semanas de haber sido transferidas al invernadero. Por otra parte, las evaluaciones realizadas cada 16 días permitió observar que las plantas de la variedad Mex 79-431 crecidas en los tratamientos, tuvieron un número de hojas muy similar durante los primeros 48 días de cultivo, pero después las plantas que provenían de un medio de cultivo con agar pero sin AIB formó un mayor número de éstas (Figura 37 A). Por otra parte, las plantas del tratamiento M-S1R1 no mostraron cambios en su número de hojas durante los primeros 32 días, pero después de este tiempo se registró un aumento muy evidente. Asimismo, a pesar de que las plantas crecidas en S1 y en un medio con AIB, al inicio de la aclimatación tenían un número de hojas menor que aquellas cultivadas en agar, a los 64 días tenían igual número de hojas (Figura 37

A). En otras palabras, para la variedad Mex 79-431 hubo un incremento considerable en los tratamientos con sustrato a diferencia de los de agar que se mantuvieron más constantes.

Cuadro 5. Número de hojas, longitud del tallo y diámetro del tallo de las plantas de caña de azúcar de dos variedades de caña de azúcar después de 64 días de crecerlas en el invernadero.

TRATAMIENTO	Número de hojas	Longitud del tallo (cm)	Diámetro del tallo (cm)
M-AR1	5.7 a	5.7 ab	2.5 a
M-AR2	5.2 a	6.2 a	2.9 a
M-S1R1	4.5 a	4.0 b	2.2 a
M-S1R2	5.6 a	4.1 b	2.3 a
M-S2R1	5.1 a	4.4 b	2.1 b
M-S2R2	ND	ND	ND
L-AR1	5.3 a	5.6 a	3.0 a
L-AR2	5.4 a	5.2 ab	2.8 a
L-S1R1	5.5 a	5.3 ab	2.7 a
L-S1R2	ND	ND	ND
L-S2R1	5.4 a	5.3 ab	2.6 a
L-S2R2	4.7 a	4.1 b	2.1 b

Para la variedad L 60-14 se presentó una tendencia similar a la observada en Mex 79-431 en la mayor parte de los tratamientos, excepto en las plantas cultivadas en el sustrato 1 (S1) y un medio sin AIB (R1), en las que el número de hojas se incrementó mucho más rápido de los 32 a los 64 días (Figura 37 B).

Rodríguez *et al.* (2000) y Rodríguez *et al.* (2003) por su parte obtuvieron 4.1 hojas como máximo a los 42 días de aclimatación de plántulas de caña de azúcar variedad C91-301 micropropagadas. Por otra parte, en este estudio se obtuvo hasta (5.2 hojas en promedio) en la variedad L 60-14 a los 48 días (Cuadro 5).

Estos autores mencionan que durante la aclimatación de caña de azúcar se presentan dos etapas; la primera, presenta un crecimiento lento y baja formación de raíces y hojas debido a que las plantas realizan sus funciones a partir de las reservas obtenidas *in vitro*, la segunda se caracteriza por un crecimiento rápido asociado a la formación de un sistema radical y hojas totalmente funcionales. Lo anterior, debido a un incremento en los niveles de almidón, fructuosa, glucosa y actividad enzimática de las invertasas ácidas en los primeros seis días en la fase de aclimatación.

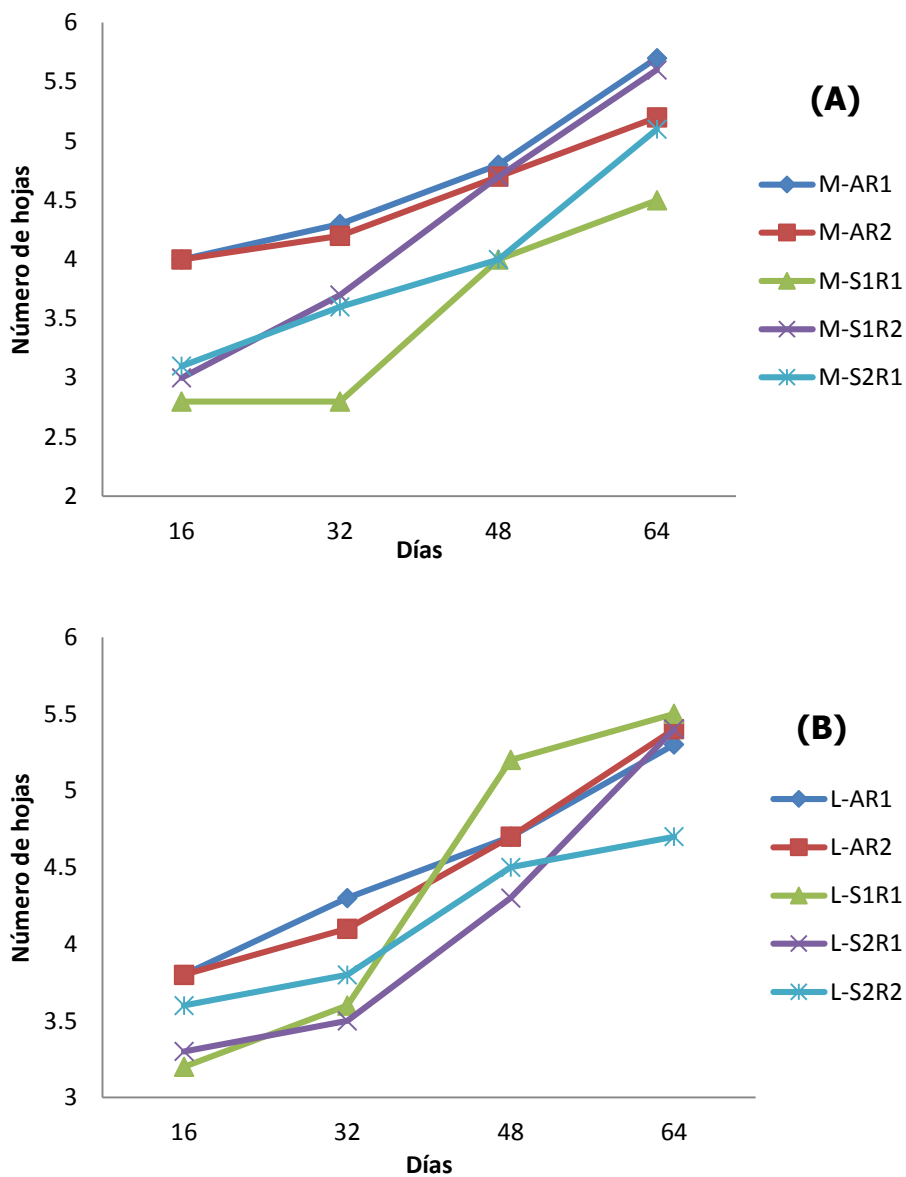


Figura 37. Número de hojas formadas por plantas de dos variedades de caña de azúcar enraizadas *in vitro* en diferentes tratamientos por efecto de la interacción después de 64 días. A: variedad Mex 79-431; B: variedad L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: MS sin reguladores; R2: MS, 1 mg L⁻¹ AIB.

Longitud del tallo

Efecto de los tratamientos

Sólo las plantas provenientes de los tratamientos M-S1R1 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.5 mm, sin AIB), M-S1R2 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.5 mm, medio con AIB), M-S2R1 (Mex 79-431, vermiculita-perlita 0.25 mm, medio sin AIB) y L-S2R2 (L60-14, vermiculita-perlita 0.25 mm, medio con AIB) tuvieron una longitud de tallo menor que la de los tratamientos M-AR2 y L-AR1 (Cuadro 5).

Asimismo, plantas de la variedad L60-14 que provenían de dos tratamientos que incluían sustratos y medio sin reguladores (L-S1R1 y L-S2R1) mostraron una longitud de tallo estadísticamente igual que las de los tratamientos M-AR1 y L-AR1 constituidos por las variedades Mex 79-431 y L 60-14, agar y medio sin AIB.

Lo anterior indica que para la variedad L60-14 el enraizamiento en el sustrato 1 (vermiculita-perlita 0.5 mm) y el medio R1 (sin AIB) puede promover mayor longitud del tallo en condiciones *ex vitro*, mientras que para la variedad Mex 79-431 esta misma respuesta se lograría enraizando los brotes en medio con o sin AIB y agar.

Aunque en un inicio las plántulas generadas en sustratos tuvieron los valores de longitud más bajos, fue evidente la velocidad de crecimiento que mostraron las plántulas de la variedad L 60-14 producidas en sustratos hasta alcanzar longitud

de las plantas enraizadas en agar (Figura 38 B). Lo anterior se puede traducir en un mayor grado de vigor y adaptación, ya que de los 32 a 48 días los tratamientos con agar se mantuvieron constantes y las plántulas de los sustratos si continuaron su desarrollo invirtiendo energía en el crecimiento del tallo.

Las evaluaciones de la longitud del tallo en la variedad Mex 79-431, a lo largo del tiempo, mostraron que las plantas provenientes de los tratamientos que incluyeron agar, tuvieron una velocidad de crecimiento similar entre ellos, y mayor que las cultivadas en sustratos (Figura 38 A). En tanto que las plantas de la variedad L 60-14 crecidas sobre vermiculita-perlita con tamaño de partícula de 0.5 mm (S1) y un medio sin AIB (R1), mostraron una velocidad de crecimiento similar al de las plantas crecidas en agar y medio sin AIB (Figura 38 B).

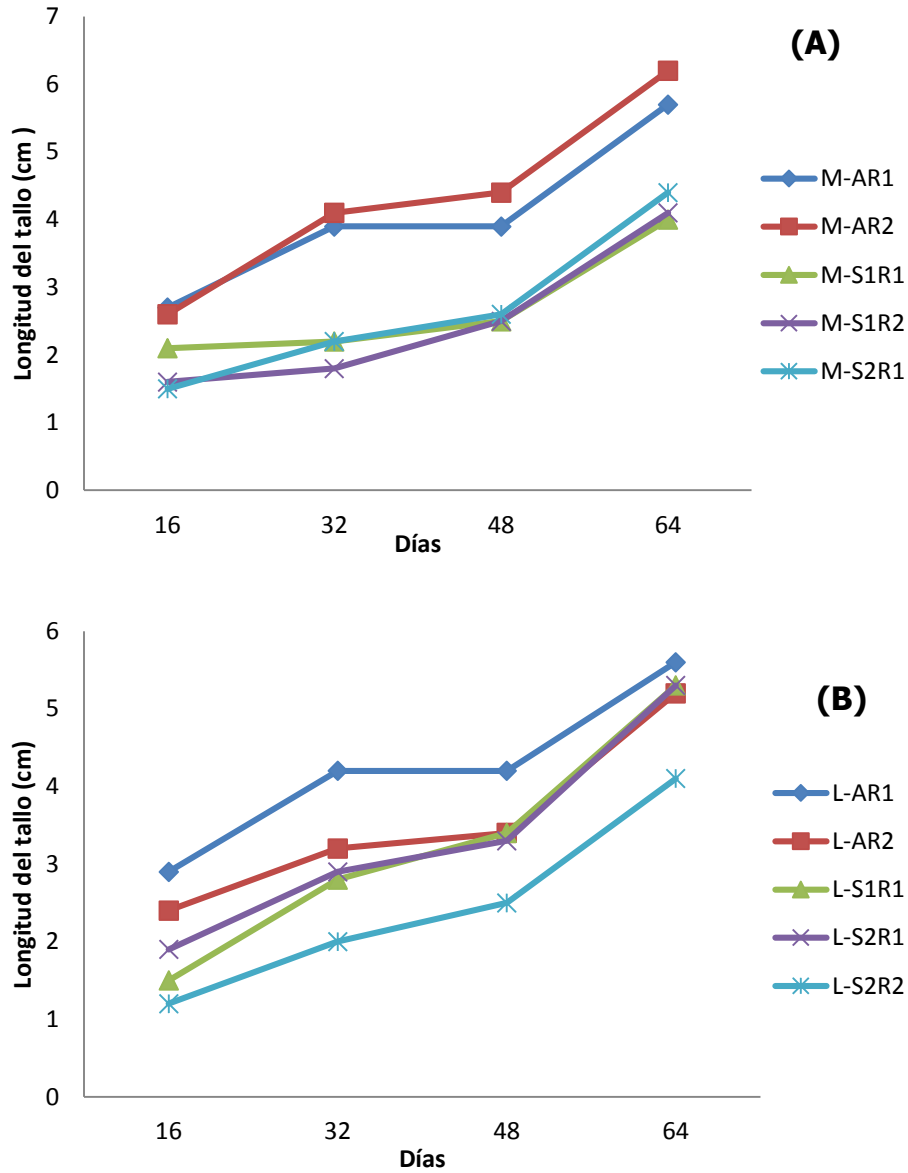


Figura 38. Longitud del tallo de plantas de dos variedades de caña de azúcar enraizadas *in vitro* en distintos tratamientos por efecto de la interacción, crecidas en el invernadero durante 64 días. A: Variedad Mex 79-431; B: Variedad L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: MS sin reguladores; R2: MS, 1 mg L⁻¹ AIB.

Diámetro del tallo

Efecto de los tratamientos

No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos probados, excepto para las plantas que provenían de los tratamientos M-S2R1 (Mex 79-431, vermiculita perlita 0.25 mm, medio sin AIB) y L-S2R2 (L 60-114, vermiculita perlita 0.25 mm, medio con AIB) que mostraron el menor diámetro de tallo (Cuadro 5).

El no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos constituidos tanto por la variedad Mex 79-431 y L 60-14, así como por sustratos y medio sin AIB, con respecto a los gelificados con agar y adicionados con AIB, indica que es posible sustituir el agar por sustrato y no adicionar auxinas al medio sin que se afecte el diámetro del tallo.

Durante la evaluación continua de esta variable se pudo observar que las plantas crecidas en los medios con agar y sin AIB, incrementaron el grosor de sus tallos de manera exponencial y en mayor magnitud que las plantas de los demás tratamientos. Por otra parte, las plantas crecidas en vermiculita-perlita de 0.5 mm (S1) y medio sin AIB (R1), engrosaron el tallo a menor velocidad (Figura 39 A).

En contraste, sólo las plantas de la variedad L 60-14 cultivadas en vermiculita-perlita 0.25 mm (S2) y los medios con y sin AIB (R2 y R1, respectivamente),

incrementaron el grosor del tallo a menor velocidad que las de los demás tratamientos (Figura 39 B).

Valores más altos que los obtenidos en este estudio del diámetro de tallo en caña de azúcar para la variedad C93-540, fueron reportados por Reyes *et al.* (2011) con 3.42 mm de diámetro en el tratamiento testigo y hasta 3.85 mm de diámetro en plántulas tratadas con un Fitomas-E (bionutriente vegetal).

Asimismo, Rivera (2011) obtuvo 3.9 mm de diámetro del tallo en plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086 regeneradas en agar y aclimatadas en tezontle y cascarilla de arroz a los 60 días. Una de las características que se relacionan con el grosor el tallo es la tasa fotosintética neta que depende del índice de área foliar y la disposición de las hojas (Amaya *et al.*, 1995).

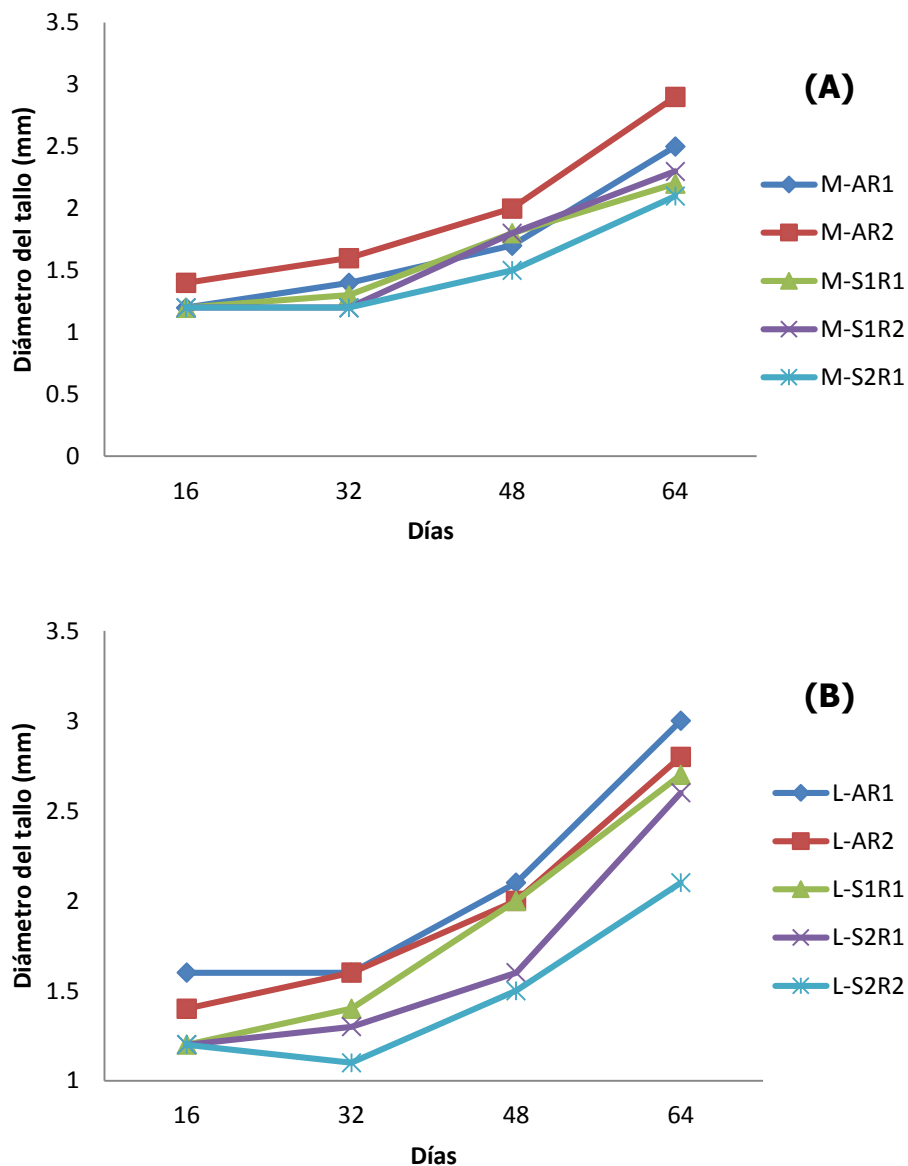


Figura 39. Diámetro del tallo de plantas de dos variedades de caña de azúcar enraizadas *in vitro* en distintos tratamientos por efecto de la interacción, crecidas en el invernadero durante 64 días. A: Variedad Mex 79-431; B: Variedad L 60-14; A: Agar; S1: vermiculita-perlita 3:1 (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita 2:1 (0.25 mm); R1: MS sin reguladores; R2: MS, 1 mg L⁻¹ AIB.

Cabe señalar que la variedad Mex 79-431 ocupa el tercer lugar dentro de las variedades de caña que prioritariamente se cultivan en México; sin embargo, son nulos los reportes sobre su propagación *in vitro*. Asimismo el último reporte de cultivo *in vitro* para la variedad L 60-14 data de hace 29 años. Por lo tanto, este trabajo proporciona información relevante sobre el cultivo *in vitro* de estas variedades. Por otro lado, hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer trabajo en que se utilizan sustratos para la regeneración *in vitro* de estas variedades.

Los resultados aquí obtenidos mostraron que la utilización de sustratos no permitió inducir brotes adventicios de manera eficiente, pero si pueden ser usados como sustitutos del agar durante la fase de enraizamiento *in vitro*, reduciendo con ello los costos de producción.

Análisis de costos de producción

En el Cuadro 6 se presentan el costo de un litro de medio Murashige y Skoog suplementado con 20 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar sin reguladores de crecimiento. Estos datos permiten observar que el agar representa el 83% del costo del medio de cultivo.

Cuadro 6. Costo de un litro de medio de cultivo elaborado con las sales basales de Murashige y Skoog (1962).

Componentes	mg L ⁻¹	Costo por gramo (pesos)	Costo por litro (pesos)
Sales Minerales	MS		
KNO ₃	1900	4.9	9.3
NH ₄ NO ₃	1650	1.6	2.6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	1.7	0.7
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	370	5.78	2.1
KH ₂ PO ₄	170	0.44	0.075
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	27.8	2.4	0.07
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	17	4.1	0.07
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	8.6	2.3	0.02
H ₃ BO ₃	6.3	1.5	0.009
KI	0.83	13.2	0.01
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	8.94	0.002
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	80	0.002
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.025	2.5	0.00006
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3	5.09	0.2
Glicina	2.0	7.62	0.8
Mio-inositol	100	7.57	0.7
Ácido nicotínico	0.5	38	0.02
Piridoxina	0.5	22	0.01
Tiamina	1.0	13	0.01
Sacarosa	20000	0.02	0.4
Agar	7000	12.2	85.4
		Total	102.4

<http://www.sigmaaldrich.com/mexico.html> (Consultada 22 de mayo de 2015).

Asimismo en los Cuadros 7 y 8 de muestra el costo (por litro) de las combinaciones entre medios y sustratos utilizados en esta investigación para inducir la formación de brotes adventicios y el enraizamiento de los mismos.

Cuadro 7. Costo (en pesos por litro) de medios para la inducción de brotes con agar o sustratos.

Componentes	AM1	AM2	AM3	S1M1	S1M2	S1M3	S2M1	S2M2	S2M3
MS	17	17	17	17	17	17	17	17	17
A	85.4	85.4	85.4	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	3	3	3	2	2	2
Cinetina	-	0.09	-	-	0.09	-	-	0.09	-
BAP	-	20	-	-	20	-	-	20	-
TDZ	-	-	40.4	-	-	40.4	-	-	40.4
Total	102.4	122.5	142.8	20	40.09	60.4	19.0	39.09	59.4

MS: Medio Murashige Skoog; A: agar; VP: vermiculita perlita; BAP:

benzilaminopurina; TDZ: thidiazuron; S1: vermiculita-perlita (0.5 mm); S2:

vermiculita-perlita (0.25 mm); M1: medio MS sin reguladores; M2: MS, 0.1 mg L⁻¹

de cinetina, 2 mg L⁻¹ de BAP; M3: MS, 0.5 Mg L⁻¹

Cuadro 8. Costo (en pesos) por litro de los medios de enraizamiento con agar o sustratos.

Componentes	AR1	AR2	S1R1	S1R2	S2R1	S2R2
MS	17.3	17.3	17.3	17.3	17.3	17.3
A	85.4	85.4	-	-	-	-
VP	-	-	3	3	2	2
AIB	-	0.1	-	0.1	-	0.1
Total	102.7	102.8	20.3	20.4	19.3	19.4

MS: Medio Murashige Skoog; A: agar; VP: vermiculita perlita; AIB: ácido

indolbutirico; S1: vermiculita-perlita (0.5 mm); S2: vermiculita-perlita (0.25 mm);

R1: sin AIB; R2: con AIB.

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación, la formación de brotes adventicios en ambas variedades de caña de azúcar se dio de manera más eficiente en los medios M2 o M3 gelificados con agar que con sustratos. En tanto que la combinación del sustrato S2 (vermiculita-perlita con tamaño de partícula

0.25 mm) y un medio sin AIB promovió valores similares que los medios con AIB gelificados con agar (que se utilizan convencionalmente), para la mayoría de variables analizadas durante la fase de enraizamiento y aclimatación. Lo anterior, permite proponer un protocolo para la propagación *in vitro* de las dos variedades estudiadas, en el que la fase de inducción de brotes se lleve a cabo en un medio suplementado con TDZ gelificado con agar, y el enraizamiento en un medio sin auxinas (AIB) y vermiculita-perlita (0.25 mm) como sustituto del agar. La propagación mediante el protocolo propuesto sería 42% más económico que el que utiliza agar para todas las fases y AIB durante el enraizamiento Cuadro 9.

Cuadro 9. Costo (en pesos) por litro de medio de cultivo en el método convencional y el método propuesto.

Método	Medio de cultivo de inducción de brotes	Medio de cultivo de enraizamiento	Total
Convencional (con agar en todas las fases)	142.8	102.8	245.6
Propuesto (con sustratos)	122.5	19.3	141.8

CONCLUSIONES

- ❖ La respuesta *in vitro* tanto en la etapa de inducción de brotes como durante la fase de enraizamiento estuvo en función de la variedad.
- ❖ Ninguno de los sustratos fue mejor que el agar para promover la formación de brotes adventicios.
- ❖ Los medios que contenían reguladores de crecimiento (M2 y M3) indujeron la formación de brotes adventicios de manera más eficiente que el medio que carecía de éstos.
- ❖ La combinación entre el sustrato 2 (vermiculita-perlita con tamaño de partícula 0.25 mm) y un medio sin AIB (R1) tuvo un efecto positivo y en la mayoría de las variables evaluadas durante la fase de enraizamiento y aclimatación.
- ❖ El uso de sustratos y medios sin AIB durante el enraizamiento reducen significativamente los costos de producción.

LITERATURA CITADA

- Abdelnour-Esquivel, A., and J. Vicent. 1994. Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica. 38p.
- Afreen-Zobayed, F., S.M.A. Zobayed., C. Kubota., T. Kozai and O. Hasegawa. 2000. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Science*. 157:225-231.
- Aguilar-Rivera, N., A. Arturo-Rodríguez, A. Castillo-Morán, A. Herrera-Solano. 2012. Sucroquímica, alternativa de diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar. *Multiciencias*. 12: 7-15.
- Aguilar-Rivera, N., G. Galindo- Mendoza., J. Fortaneli-Martínez y C. Contreras-Servín. 2011. Factores de Competitividad de la agroindustria de la caña de azúcar en México. *Región y Sociedad*. 52:262-297.
- Alarcón, A.L. 2001. El boro como nutriente esencial. *Horticultura*. 155: 1-11.
- Al-Bahrany, A.M. 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae*. 4: 285-295.
- Alvarado, Y., M. Cruz., N. Portal., M. Acosta y M. Leiva. 2004. Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento de contaminantes bacterianos de la micropropagación de la caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal*. 3: 139-142.
- Amasino, R. 2005. 1955: Kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiology*. 138: 1177-1184.
- Amaya, E. A., J.H. Cock., A. Hernández., J. Irvine. 1995. El Cultivo de la caña de azúcar en la zona azucarera de Colombia. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar en Colombia, Cenicafé. Colombia. 394 p.
- Anicua, R., M.C. Gutiérrez., P. Sánchez., C. Ortiz., V.H. Volke y E. Rubiños. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. *Agricultura Técnica en México*. 35: 147-156.
- Anicua, S. R. 2008. Caracterización física y micromorfología de materiales orgánicos e inorgánicos para la generación de mezclas de sustratos en la producción de *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 198 p.
- Arévalo, R. A., E. I. Bertoncini, N. Guirado, S. Chaila. 2006. Los términos variedad o variedad de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 1: 5-9.
- Armenta-Bojórquez, A. D., C. García-Gutiérrez., J. R. Camacho-Báez., M. A. Apodaca-Sánchez., L. Gerardo-Montoya y E. Nava Pérez. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 6: 51-56.
- Aureoles-Rodríguez, F., J. L. Rodríguez-de la O., J. P. Legaria-Solano., J. Sahagún-Castellanos y M. G. Peña-Ortega. 2008. Propagación *in vitro* del 'maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 3: 263-269.
- Baksha, R., R. Alam., M.Z. Karim., S.K. Paul., M. A. Hossain., M. A. S. Miah., and A. B. M M. Rahman. 2002. *In vitro* shoot tip culture of sugar-cane (*Saccharum officinarum*) variety Isd 28. *Biotechnology*. 2-4: 67-72.
- Baran, T., and B. Ghosh. 2005. *Plant Tissue Culture Basic and Applied*. Universities Press. India. 207 p.
- Barceló-Coll, J., G. Nicolás-Rodrigo, B. Sabater-García. 1995. *Fisiología Vegetal*. 6 ed. Pirámide. 662 p.

- Bonnel, E., Y. Demarly, S. Essad. 1983. Evolution anatomique des tissus foliaires de canne a sucre (*Saccharum* spp) cultives *in vitro*. Canadian Journal of Botany. 3: 830-836.
- Bulbarela, J.E. 2014. Obtención *in vitro* de plantas de *Echeveria pumila* cv. Glauca libres de acterías y fitoplasmas asociados a la fasciación del tallo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 109 p.
- Burés, S. 1997. Sustratos. Agrotecnicas S.L. 331 p.
- Cadahí L, C. 2005. Fertirrigación Cultivos Hortícolas, Frutales y Hornamentales. 3ª edición. Mundi-Prensa. España. 340 p.
- Campbell, N. A y J. B. Reece. 2007. Biología. Médica Panamericana, 7ª. Edición. España. 1351p.
- Castañeda-Castro, O., L. I. Trejo-Téllez, F.C. Gómez-Merino, L. Jácome-Ortíz, H. Hernández de la Luz, V. Morales-Ramos, M.T. González-Arno, Y.M. Martínez-Ocampo, R. Gámez-Pastrana, M.C. Pastelín-Solano. 2014. Respuestas de las variedades Mex 69-290 y CP 72-2086 de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a la salinidad. Agroproductividad. 7: 55-59.
- Castillo, R.O., E. Silva. 2004. Fisiología, Floración y Mejoramiento genético de la Caña de Azúcar en Ecuador. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar el Ecuador. Publicación Técnica 3:1-26 p.
- Chavarría, E., B. Jiménez y F. Yeh. 1999. Protocolo para la reproducción masiva *in vitro* de caña de azúcar en Costa Rica. XI Congreso Nacional Agronómico. Resumen. Costa Rica. 117-118 p.
- Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica. 2011. Manual Azucarero Mexicano. Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica. Edición 2011. México, D. F. <http://www.camaraazucarera.org.mx/>
- CNIAA, 2011. Manual Azucarero Mexicano. Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica. Edición 2011. Mexico, D.F.
- Crozier, A., Y. Kamiya, G. Bishop and T. Yokota. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. En: Buchanan, B., W. Grissem, R. Jones. (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. The netherlands. 537 p.
- De Boot M., O. Verdonk and I. Cappaert. 1974. Method for measuring the water release curve of organic substrates. Acta Horticulturae. 37:2054-2062.
- Dethier, S. M. 1993. Optimization of plant regeneration and rooting from leaf explants of five rare *Haworthia*. Scientia Horticulturae. 56:157-161.
- Díaz, L. L y E. D. Portocarrero. 2002. Manual de Producción de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis de licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. 131 p.
- Díaz, L. P., L. F. Medina., J. Latife., P. A. Digonzelli., S. B. Sosa. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. Revista de Investigaciones Agropecuarias. 2:115-128.
- Digonzelli, P.A., E.R. Romero., J. Scandalariis., O. Arce., J. Giardina., S. Casen., y L. Alonso. 2006. Producción de caña semilla en semilleros registrados provenientes de micropropagación y de hidrotermoterapia de tres variedades de caña de azúcar. Revista Industrial Agrícola de Tucuman. 83(1-2):9-17.
- Digonzelli, P. A., E. R. Romero., J. Scandalariis., O. Arce., J.F. Ullivan, J. Tonatto y M.F. Leggio. 2006. Dinámica de la brotación potencial de caña semilla micropropagada y termotratada de tres cultivares de caña de azúcar. Revista Industrial Agrícola de Tucuman. 83 (1-2): 1-7.
- Doerner, P. 2000. Cell division regulation. In: Buchanan B., W. Grissem, R. Jones. (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA. 1296 p.

- Dutt, N. L. and J. T. Rao. 1950. The present taxonomic position of *Saccharum* and its congeners. Proc. Congr. International Society of Sugar Cane Technologist, Brisbane. 7: 288-293.
- Enriquez-Poy, M. 2013. Azúcar de caña, la amargura del éxito. Revista Asociación de Técnicos Azucareros de México. 26: 40-44.
- Falcon, A. B. y J. C. Cabrera. 2007. Comunicación corta, actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturonidos en pecíolos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). Cultivos Tropicales. 2:87-90.
- Flores, S. 2001. Las Variedades de caña de azúcar en México. Asociación de Técnicos Azucareros de México. 308 p.
- Franck, T., C. Kevers., T. Gaspar., J. Amas., C. Deby., R. Greimers., D. Serteyn., and G. Deby-Dupont. 2004. Hiperhidricidad de *Prunus avium* dispora cultivadas en gelrite: una respuesta de estrés controlado. Fisiología Vegetal y Bioquímica. 6:519-527.
- Franklin, G., S. Arvinth, C.J. Sheeba, M. Kanchana, N. Subramonian. 2006. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) midrib segment explants. Plant Growth Regulation. 50:111-119.
- <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1525s/a1525s07.pdf>
- Gallo-Meagher, M., R.G. English, and A. Abouzid. 2000. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. In Vitro Cell and Developmental Biology Plant. 40: 36:37.
- García, L., J. N. Pérez, M. Rodíguez, B. Pérez, Y. Martínez, Z. Sarría. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. Biotecnología Vegetal. 4(2): 101-105.
- García, C., G. Alcántar., I. Cabrera., F. Gavi., V. Volke. 2001. Evaluación de sustratos para la producción de *Epipremnum aureum* y *Spathiphyllum wallisii* cultivadas en maceta. Terra Latinoamerica. 3: 249-258.
- García, C. H. R. 1997. La agroindustria azucarera de México frente a la apertura comercial. Centro de Investigaciones Económicas Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 210 p.
- García, E. A. 1984. Manual del campo cañero mexicano. Serie divulgación Técnica. IMPA. Libro No. 24. México, D.F. 469 p.
- García, F. J., J. Roselló, M. P. Santamarina. 2006. Introducción al Funcionamiento de las Plantas. Universidad Politécnica de Valencia. España. 182 p.
- García, L., J. N. Pérez, M. Rodríguez, B. Pérez, Y. Martínez y Z. Sarría. 2003. Influencia de la formulación salina en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar dos temperaturas. Biotecnología Vegetal. 3: 155-160.
- García, M. y E. Medina. 2010. Crecimiento y morfología radical en dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) sometidos a salinización con sales simples o suplementadas con calcio. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ. 27: 17-38.
- George, E., M. A. Hall, G. De Klerk. 2008. The components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro- Nutrients. 3 ed. Springer Netherlands. Holanda. 113 p.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture Part 1: the technology. Exegetics. London. 574 p.
- Godoy, L., E. Héctor., B. Díaz., A. Chea, A. Torres. 2005. Efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *Mentha piperita* y *Mentha citrata*. Cultivos Tropicales. 1:73-75.
- IMPA, 1981. Catálogo de Variedades. Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar (IMPA). Editorial de la Comisión Nacional de la Industria Azucarera de México. México, Distrito Federal. 149 p.

- Gómez-Merino, F.C., L. I. Trejo-Téllez, V. Morales-Ramos, J. Salazar-Ortiz, J. Velazco-Velasco, H. E. Senties-Herrera, P. Ladewig. 2014. Necesidades de Innovación en la Producción de Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.). Agroproductividad. 2:22-26.
- González, V, S. Castroni y F. Morela. 1995. Evaluación de la reacción de genotipos de caña de azúcar a diferentes concentraciones de NaCl. Agronomía Tropical 2:219-232.
- González, J., D. Castro. 2002. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. Agricultura Técnica. 1: 68-78.
- González- Suárez, S., P. Garbey-González, Y. Álvarez-Aragón, D. Benítez-López y J.C. Cabrera-Pino. 2000. Actividad peroxidasa en callos de caña de azúcar tratados con un oligopectato. Revista del Jardín Botánico Nacional. 1:89:94.
- Hernández, E. 2013. Embriogénesis somática *in vitro* y aclimatación de plántulas obtenidas por organogénesis directa en *Heliconia* spp. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 96 p.
- Hernández-Cázar, A. S. 2014. La agroindustria de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en México. Agroproductividad. 2:35-41.
- Hidalgo, L., J. Hidalgo. 2011. Tratado de Viticultura II. Mundi Prensa. 4º edición. España. 1033 p. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/URN:catalog:IBUNAM:MEXU:OAX287715>
Consultada el 28-05-14.
- <http://www.fao.org/docrep/005/x4988e/x4988e03.htm>
- <http://www.hydrocultura.com.mx/2011/11/23/sustratos/> Consultada 09-06-13
- Jay-Allemand, C., P. Capelli., D. Cornu. 1992. Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. Scientia Horticulturae. 51:335-342.
- Jimarez-Montiel., M. J. 2014. Regeneración de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de cultivos hidropónicos *in vitro*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 126 p.
- Jordán, M y J. Casaretto. 2006. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En: Squeo, F.A and L. Cardemil, (eds). Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 15:1-28.
- Usui, K., K. Okabe, R.V. Pernillo y A.E. Ramírez. 1996. Principios Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Japan Overseas Cooperation Volunteers. Guatemala. 166p.
- Karim, M. Z., M. N. Amin, M. A. Hossain, S. Islam, F. Hossin, R. Alam. 2002. Micropropagation of two sugarcane (*Saccharum officinarum*) varieties from callus culture. Journal of Biological Sciences 2:682-685.
- Kumar, K. Sahoo, S. 2009. Rapid *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. Nature and Science. 4:1-10.
- Labrousse, P., D. Delmail., R. Decou., M. Carlué., S. Lhernould., and P. Krausz. 2012. *Nemesia* root hair response to paper pulp substrate for micropropagation. The Scientific World Journal. 1-7.
- Licea, R. J., M. Fernández, K. Alvarado y R. Gómez. 2001. Influencia de la concentración de agar sobre la multiplicación *in vitro* de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. Biotecnología Vegetal. 1: 77-81.
- Ludwig-Müller, J. and J. D. Cohen. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. Physiologia Plantarum 2:320-329.
- Maher, M., M. Prasad, and M. Raviv. 2008. Organic soilless media components. In: Raviv M. and H. Lieth (eds.). Soilless Culture: Theory and Practice. Elsevier. United States of America. 582p.

- Marga, F., L. Verbet y H. Morvan. 1997. Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 49:1-5.
- Marquez-Trejo, A., E. Llamas-Cervantes., L.F. Sánchez-Iñiguez., S. Claderon-Valdivia. 1994. Prueba de variedades de caña de azúcar en el ciclo resoca "Ingenio Tamazula". Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 53 p.
- Martínez-Hernández, M. J., A. Alonso-López., F. Osorio-Acosta., F. Gallardo-López., y M. Mata-Rosas. 2006. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Interciencia*. 8:616-619.
- Martin-Gordo, D.A., O. Cárdenas-González., y J. Constantino-Pacheco. 2012. Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medio de cultivo para propagación *in vitro*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2:49-62.
- Marulanda, M. L., M. Carvajalino., y H. Vento. 2000. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda (Colombia). *Actualidades Biológicas*. 73:121-129.
- Masera, O., F. Coralli, C. García, R. Riegelhaupt, T. Arias, R. Díaz, G. Guerrero, L. Cecott. 2011. La bioenergía en México situación actual y perspectivas. *Red Mexicana de Bioenergía, A.C. México*. 42 p.
- MEXU, 2014 " Colecciones Biológicas, *Saccharum officinarum*" (<http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/23907?proyecto=Irekani>)
- Mohamed, M. A. H., A. A. Alsadon, M. S. Al Mohaidib. 2010. Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 9:12-16.
- Mohan, R., C. R. Soccol, M. Quoirin, and A. Pandey. 2004. Use of sugarcane bagasse as an alternative low-cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In Vitro Cellular Development Biology Plant*. 40: 408-411.
- Mohan, R., E. A. Chui, L. A. Biasi, and C. R. Soccol. 2005. Alternative *in vitro* propagation: use of sugarcane bagasse as low cost support material during rooting stage of strawberry cv. *Dover*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48:37-42.
- Mok, C., D. W. S. Mok and D. J. Armstrong. 1982. Citokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry*. 21:1509-1511.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497.
- Murray, W.N. 2005. *Introducción a la botánica*. Editorial Pearson. 744p.
- Murthy, B.N.S., S.J. Murch., and P.K. Saxena. 1998. Thidiazuron: a potent regulador of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular Development Biology*. 34:267-275.
- Newell, C., D. Gowns, and J. McComb. 2003. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 75:131-142.
- Nieves N, A. Poblete, M. Cid, Y. Lezcano, J. L. González-Olmedo, J. C. Cabrera. 2006. Evaluación del pectimorf como complemento del 2,4-D en el proceso de embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum* spp). *Cultivos Tropicales*. 27:25-30.
- Oberschelp, G. P. J y M. A. Marco. 2010. Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y la altura de plantines clonales de *Prosopis alba* Grisebach. *Quebracho*. 1:112-119.
- Otahola-Gómez, V. A. y M. J. Díaz-González. 2010. Regeneración *in vitro* de *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y bencilaminopurina. *Revista Científica UDO Agrícola*. 1:23-28.

- Pagés, M. y A. Matallana. 1984. Caracterización de las propiedades físicas, en los substratos empleados en horticultura ornamental. Comunicaciones. Instituto Nacional de Investigación y tecnología Agraria y alimentaria. (INIA) Serie Producción Vegetal. España. 61:37p.
- Park, S.W., J.H. Jeon, H.S. Kim, Y.M. Park, C. Aswath y H. Joung. 2004. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 2:199-205.
- Parreño-Humanante, J.G. 2012. Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) –variedad CP 72-2086-. Tesis de Licenciatura. Zamorano Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. 30 p.
- Pérez, A. T., L. Nápoles., O. Concepción y R. Trujillo. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales*. 3:57-61.
- Pérez, J. 1993. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. *En: Roca, W. M., L. A. Mrozinski. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional Agricultura Tropical. Texas, E.U. 969 p.*
- Pérez-Molphe-Balch, E. M., R. Ramírez-Malagón., H. Gordon-Núñez-Palenius y Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 179 pp.
- Puente, J. 1996. El enraizamiento *in vitro* del manzano (*Malus x domestica* Borkh.). Tesis de Doctorado. Universidad de Salamanca. Salamanca, España. 160 p.
- Ranjan, C and A. Pongener. 2013. A study on the use of low cost substrata against agar for non-symbiotic seed culture of *Cymbidium iridioides* D. Don. *Australian Journal of Crop Science*. 5:642-649.
- Raven, P. H., R. F. Evert y S.E. Eichhorn. 1992. *Biología de las Plantas*. Editorial Reverté. España. 402p.
- Rivera, L.Y. 2011. Aclimatación de vitroplantas y tolerancia a cadmio en caña de azúcar. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 108 p.
- Robledo, A., G. Carrillo. 2004. Regeneración *in vitro* de plantas de chile (*Capsicum annum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocotilos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2:121-126.
- Robledo-Paz, A., V. M. Villalobos-Arámbula., y A. Santacruz-Varela. 2009. Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus Maximartinezii* Rzedowski. *Acta Botánica Mexicana*. 89:47-62.
- Rodríguez, R., M. Escalona., Y. Rodríguez., M. Cid., J. L. González-Olmedo. 2000. Aclimatización de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) provenientes de sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*. 3:51-56.
- Romay, G., J. Matheus, A. Gerlts, R. Rueda y M.A. Santana. 2006. Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia*: 3:686-689.
- Sabaz, A. K., R. Hamid., M. C. Fayyaz., C. Zubeda., F. Zarrin., U.S. Sadar., and Z. Muhammad. 2009. Effect of cytokinins on shoot multiplication in three elite sugarcane varieties. *Pakistan Journal of Botany*. 14:1651-1658.
- Salgado, S., L. C. Lagunes, R. Nuñez, C. F. Ortíz, E. M. Aranda. 2013. Caña de Azúcar Producción Sustentable. Biblioteca Básica de Agricultura. México. 524 p.
- Sánchez, N. F. 1972. *Materia Prima: caña de Azúcar*. Porrúa Hnos. y Cía. Texas, E.U. 583 p.

- Saucedo, S. G., L. E. Ramos y T. X. Reyes. 2008. Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Ciencia y Tecnología. 1:17-21.
- Scholten, H. J and R. L. M. Pierik. 1998. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. Plant Cell Reports. 17:230-235.
- Seabrook, J. E. A. 1980. Laboratory culture. In: Staba, E. J. (Ed.). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp: 1-20.
- Sentíes-Herrera, H. E. 2013. Variabilidad genética y caracterización de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 142p.
- Shan, X., D. Li and R. Qu. 2000. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. In vitro Cell Dev. Biol. 36:207-210.
- Shimelis, D., K. Bantte and T. Feyissa. 2014. Interaction effects of 6-benzylaminopurine and kinetin on *in vitro* shoot multiplication of two Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes. Advances in Crop Science and Technology. 4:1-5.
- SIAP-SAGARPA. 2015. SERVICIO DE INFORMACION AGROALIMENTARIA Y PESQUERA. <http://www.siap.gob.mx/>
- Simón, E., L. Moysset. 2006. Prácticas de crecimiento y desarrollo de los vegetales. Textos Docentes. Barcelona, España. 96p.
- Steiner, A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant Soil. 15:134-154.
- Subirós, F. 2000. El cultivo de la caña de azúcar. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). San Jose, Costa Rica. 448p.
- Taiz, L., E. Zeiger. 2006. Fisiología Vegetal. Universitat Jaume. E.U. 1343 p.
- Tello, P., J. M., F. Martos, J. M. González, N. López, M. L. Barasona, J. Ruiz de Azúa, J. M. Antón G. Rodríguez-Solís, M. A. Villar- Martínez, J. A. Martínez, F. Manjón-Cabeza, J. A. Martínez, J. M. Palomo. 2004. Peones del Cabildo Insular de Gran Canaria. Editorial MAD. Alcalá de Guadaíra, España. 470p.
- Terrés, V. L., A. Artetxe, A. Beunza, E. Sáins de la Maza and M. Lenzaun. 2001. Physical properties of the substrates. Acta Hortícola. 559: 663-668.
- Tolera, B., M. Diro and D. Belew. 2014. Effects of 6-benzylaminopurine and kinetin on *in vitro* shoot multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties. Advances in Crop Science and Technology.3: 1-5.
- Torroba, M. C., H. A. Paccapelo, L. Aguilera, J. Mazzola. 2008. Micropropagación de plantas en líneas experimentales de maíces forrajeros derivadas de un cruzamiento entre *Zea mays* L. y *Zea diploperennis*ltis, Doebley y Guzmán. Phyton: 77: 93-102.
- Trippi, V. S. 2007. El envejecimiento de los clones. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Buenos Aires, Argentina. 111 p.
- Uribe-Moraga, M., L. Cifuentes. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. Bosque. 25:129-135.
- Valdez, T. y G. Rodríguez. 1981. Influencia de la edad y la distancia de siembra en el desarrollo del sistema radicular de dos variedades de caña de azúcar Memorias de la 43 Conferencia. Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba, Habana, Cuba. 35 p.

- Vargas, T. P., J. R. Castellanos, R. J. Muñoz, P. G. Sánchez, L. C. Tijerina, R. R. López, C. M. Sánchez, J. A. Ojodeagua. 2008. Efecto del tamaño de partícula sobre algunas propiedades físicas del tezontle de Guanajuato. México. Agricultura Técnica en México. 34:323-331.
- Vargas-Castillo, M.P., y A. Abdelnour-Esquivel. 2010. Cultivo *in vitro* de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) a partir de embriones cigóticos. Agronomía Mesoamericana. 1:73-83.
- Vazquez-Hurtado, N. B. 2014. Germinación y propagación de *Tillandsia macdougallii* L. B Sm. Y *Tillandsia violácea* Baker (Bromeliaceae) con fines de aprovechamiento sustentable. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 154 p.
- Villegas, T. F. 2010. El sistema radical de la caña de azúcar. El sistema radical de las plantas y la absorción de los nutrimentos. Revista Técnicaña. CENICAÑA. 25:25-29.
- Wai-Jane, H. y I. K. Vasil. 1983. Somatic Embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma. 118:169-180.
- White, J. W., C. Gómez, C. Valencia. 1988. Conceptos básicos de la fisiología del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 55 p.
- Yadav D. V., R. Jain y R. K. Rai. 2010. Impact of heavy on Sugarcane. *In*: I. Sherameti and A. Varma (Eds.), Soil Heavy Metals-Soil Biology. 492 p.
- Yuseli, A., J. R. Demey, V. González. 1995. Grupos homogéneos de crecimiento y manipulación *in vitro* de seis variedades comerciales de caña de azúcar en Venezuela. Agronomía Tropical. 45:51-72.
- Zamora, B. P., P. Sánchez, V. H. Volke, D. Espinosa y A. Galvis. 2005. Formulación de mezclas de sustratos mediante programación lineal. Inter ciencia. 30(6): 365-369.
- Zermeño-González, A. S. Villatoro-Moreno, J. J. Cortés-Bracho, M. Cadena-Zapata, E. A. Catalán-Valencia, M. A. García-Delgado, J. P. Munguía-López. 2012. Estimación del intercambio neto de CO₂ en un cultivo de caña de azúcar durante el ciclo de platilla. Agrociencia. 46:579-591.
- Zhao J, L. C. Davis, R. Verpoorte 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnoly Advances. 23:283-333.
- Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Horticultural Reviews. 24:1-30.