



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**EFFECTO EN LA RELACIÓN
AUXINAS/CITOCININAS EN ESTADO
NUTRIMENTAL *IN VITRO* DE CAÑA DE AZÚCAR
(*Saccharum* spp.).**

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN MANEJO Y EXPLOTACIÓN DE LOS
AGROSISTEMAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR**

P R E S E N T A

ODÓN CASTAÑEDA CASTRO

Peñuela, Mpio. de Amatlán de los Reyes, Ver.

Octubre 2007



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Q.A. ODON CASTAÑEDA CASTRO
PASANTE DE LA MAESTRIA EN MANEJO Y
EXPLOTACIÓN DE LOS AGROSISTEMAS
DE LA CAÑA DE AZÚCAR
PRESENTE:

Habiendo sido debidamente revisado y aceptado el trabajo de tesis presentado por usted denominado: **"EFECTO EN LA RELACION AUXINAS/CITOCININAS EN EL ESTADO NUTRICIONAL IN VITRO DE LA CAÑA DE AZUCAR (Saccharum spp.)"** Y estando de acuerdo con los maestros que integran la Academia de Tesis, que es satisfactorio su contenido como prueba escrita para sustentar el Examen y obtener el grado de **MAESTRO EN MANEJO Y EXPLOTACIÓN DE LOS AGROSISTEMAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR, AUTORIZO** a usted que proceda a la impresión del citado trabajo.

ATENTAMENTE

"LIS DE VERACRUZ: ARTE, CIENCIA, LUZ"

Peñuela, Municipio de Amatlán de los Reyes, Ver., a 22 de Febrero del 2008

DR. DANIEL ARTURO RODRIGUEZ LAGUNES
SECRETARIO DE LA FACULTAD CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Va.Bo.

DR. JOAQUIN MURGUIA GONZALEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
CORDOBA VER



SECRETARIA

La presente tesis titulada “EFECTO EN LA RELACIÓN AUXINAS/CITOCININAS EN EL ESTADO NUTRICIONAL *IN VITRO* DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*)”, realizada por el alumno: Odón Castañeda Castro, bajo la dirección del Tutor: Dr. Fernando Carlos Gómez Merino, Co-tutor Dra. Yolanda Martínez Ocampo, y el arbitraje del cuerpo de lectores indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN MANEJO Y EXPLOTACIÓN DE LOS
AGROSISTEMAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR**

TUTOR, CO-TUTOR Y CUERPO DE LECTORES

Tutor	 Dr. Fernando Carlos Gómez Merino
Co-tutor	 Dra. Yolanda Martínez Ocampo
Lector	 MC. Miriam Cecilia Pastelin Solano
Lector	 MC. Adolfo Castillo Morán
Lector	 MC. Lino Debernardi Mariñi

Peñuela, Mpio. de Amatlán de los Reyes, Ver.

Enero del 2008

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	7
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
RESUMEN	13
SUMMARY	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. MARCO DE REFERENCIA	17
2.1. Generalidades de la caña de azúcar	17
2.1.1 Características de la caña de azúcar	17
2.1.2 Importancia económica	21
2.1.3 Origen y distribución	22
2.2. Métodos de propagación <i>in vivo</i> de la caña de azúcar	23
2.2.1. Propagación sexual	24
2.2.2. Propagación asexual	24
2.2.2.1. Factores que afectan la brotación de las yemas	25
2.3. Micropropagación	26
2.3.1. Etapas de la micropropagación	27
2.3.2 Factores que influyen en la micropropagación	29
2.3.2.1 Medios de cultivo	30
2.3.2.2. Genotipo	32
2.3.2.3. Edad de la planta	32
2.3.2.4. Edad del órgano o tejido	32
2.3.2.5. Estado fisiológico	33
2.3.2.6. Estado sanitario	33
2.3.2.7. Efecto del tiempo atmosférico	33
2.3.2.8. Condiciones de crecimiento	34
2.3.2.9. Posición del explante dentro del frasco	34
2.3.2.10. Tamaño del explante	34
2.3.2.11 Luz	35
2.3.2.12. Temperatura	35
2.3.2.13. Contaminación	35
2.3.2.14. Otros factores	37
2.3.3.. Ventajas de la micropropagación	37
2.4. Cultivo <i>in vitro</i> de la caña de azúcar	38
2.5. La nutrición de las plantas	42
2.5.1. Elementos esenciales	43
2.5.2. Principales funciones de los nutrimentos analizados en plantas de caña de azúcar.	43
2.5.2.1. Nitrógeno	43
2.5.2.2. Fósforo	44
2.5.2.3. Potasio	44
2.5.2.4. Calcio	44
2.5.2.5. Magnesio	45

2.5.2.6. Hierro	45
2.5.2.7. Cobre	46
2.5.2.8. Zinc	47
2.5.2.9. Manganeseo	47
2.5.2.10. Boro	48
2.5.2.11. Sodio	48
2.5.3. Concentración crítica de macro y micronutrientes analizados	49
2.5.4 Relaciones entre niveles hormonales y nutrición en plantas	49
3. PLANTEAMIENTO Y DEFINICION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	52
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	53
4.1. Objetivo general	53
4.2. Objetivos específicos	53
4.3. Hipótesis	53
5. MATERIALES Y METODOS	54
5.1 Material biológico	54
5.2. Medio de cultivo	54
5.3. Condiciones ambientales <i>in vitro</i>	54
5.4. Evaluación del efecto de la Kinetina (KIN) en interacción con el ácido 1,3-ácido indol acético (AIA) en la inducción de brotes adventicios en caña de azúcar	55
5. 5. Variables a evaluar	56
5.5.1. Desarrollo	56
5.5.2. Contenido nutrimental	56
5.6. Análisis estadísticos	57
6. RESULTADOS Y DISCUSION	58
6.1. Crecimiento vegetal	58
6.1.1 Efecto de la auxina AIA en el tamaño y número de brotes y hojas	58
6.1.2 Efecto de la citocinina KIN en el tamaño y número de brotes y hojas	60
6.1.3 Efecto de la interacción de los factores AIA-KIN en el tamaño y número de brotes y hojas	61
6.2. Nutrición de las plantas	65
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
7.1. Conclusiones	78
7.2. Recomendaciones	79
8. BIBLIOGRAFÍA CITADA	80
9. APENDICE	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Principales países productores de caña de azúcar.....	21
2. Relación de tratamientos para evaluar el efecto de la relación auxina/citocinina en el cultivo <i>in vitro</i> de caña de azúcar.....	55
3. Número de brotes (NB) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.....	58
4. Tamaño de brotes (TB), Número de hojas (NH) y Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.....	59
5. Comparación de medias de la variable número de brotes (NB) en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas con diferentes niveles de la auxina AIA en el medio de cultivo.....	59
6. Número de brotes (NB), Tamaño del brote (TB), Numero de hojas (NH) y Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.....	60
7. Número y tamaño de brotes en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA y de la citocinina KIN en el medio de cultivo.....	62

8.	Número y tamaño de hojas en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA y de la citocinina KIN en el medio de cultivo.....	63
9.	Concentraciones nutrimentales en tejido vegetal de plantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 propagadas en medios de cultivo conteniendo diferentes niveles de ácido indol acético.	65
10.	Concentraciones nutrimentales en tejido vegetal de plantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 propagadas en medios de cultivo conteniendo diferentes niveles de kinetina.....	67
11.	Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de P en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	68
12.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de K en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	69
13.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de Ca en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	70
14.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de Mg en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	71

15.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutricional de Fe en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	72
16.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutricional de Cu en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	73
17.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutricional de Zn en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	74
18.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutricional de Mn en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	75
19.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutricional de B en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	76
20.	Efecto de la interacciones de AIA y KIN en la concentración nutricional de Na en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.....	77

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro	Página
1A. Compuestos inorgánicos del medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962) utilizado en la inducción de brotes de Caña de azúcar (<i>Saccharum</i> spp.).....	88
2A. Concentraciones de componentes orgánicos e inorgánicos en medios de cultivo.....	89
3A. Tamaño de brotes (TB) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.....	90
4A. Número de hojas (NH) emitidas por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.....	90
5A. Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.....	90
6A. Comparación de medias de la variable número de brotes (NB) en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas con diferentes niveles de la auxina AIA en el medio de cultivo.....	91
7A. Número de brotes (NB) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.....	91

8A.	Tamaño de brotes (TM) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.....	92
9A.	Número de hojas (NH) emitidas por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.....	92
10A.	Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.....	92
11A.	Comparación de medias de la variable número de brotes (NB) en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 como efecto de las interacciones entre los factores AIA y KIN.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Estructura del tallo de la caña de azúcar	17
2. Estructura de la hoja de la caña de azúcar.....	19
3. Aspecto de la inflorescencia de la caña de azúcar.....	20
4. Sistema radical de la caña de azúcar.....	20
5. Vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 en un medio de cultivo MS adicionado con AIA 0.5 mgL^{-1} y KIN 0.5 mgL^{-1}	64

RESUMEN

La propagación *in vitro* de caña de azúcar representa una alternativa para producir material vegetal con pureza genética y excelente estado fitosanitario. En esta investigación se estudió el efecto de cinco niveles de ácido indolacético (AIA) y cinco de kinetina (KIN) 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹ y sus interacciones sobre variables de crecimiento y nutrimentales en vitroplantas de caña de azúcar. Se utilizaron vitroplantas de la variedad ITV 92-1424, que fueron sembrados en medio de MS con diferentes niveles de AIA y KIN. El experimento tuvo una distribución completamente al azar en arreglo factorial 5². Como resultado se obtuvo mayor número de brotes y mayores contenidos de los nutrimentos P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y Na con niveles de 0.5 mg L⁻¹ de AIA y KIN.

Palabras clave: *fitohormonas, nutrición vegetal, micropropagación, saccharum spp.*

SUMMARY

In vitro propagation of sugar cane represents an alternative in the production of genetically pure plants in excellent phytosanitary conditions. In this research, the effects of five levels of indole-3-acetic acid (IAA) and five of kinetin (KIN), 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹, were studied as well as their interactions with growth and nutrimental variables in vitroplants of sugar cane. Vitroplants of the ITV 92-1424 variety were used. These were planted in a MS medium with different IAA and KIN levels. The experiment was distributed completely at random in a 5² factorial arrangement. The result was a greater number of shoots and higher content of the nutriments P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, and Na with IAA and KIN levels of 0.5 mg L⁻¹.

Key words: *phytohormones, plant nutrition, in vitro, saccharum spp.*

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) constituye una de las principales fuentes de alimentación para el hombre, además de ser materia prima para la manufactura o generación de otros productos, coproductos, subproductos y derivados. Ante la crisis de energéticos en el mundo, la caña de azúcar representa una excelente fuente para la generación de agroenergía, en particular del etanol como carburante y oxigenante de gasolina a partir de mieles iniciales y de mieles finales, así como del aprovechamiento del bagazo de la caña con fines de industrialización para la cogeneración de energía y la obtención de gas sintético. De igual manera, la caña de azúcar puede servir como materia prima para la producción de otros alimentos como sucralosa, olestra, fructooligosacáridos y farmacéuticos como sucralfate, polisucrose, esterres especiales, epóxidos, sucrogel y bioplásticos derivados de la sacarosa.

México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial como productor de caña de azúcar con una superficie de 680 mil hectáreas y cultivándose en 15 estados. En el país operan 58 ingenios azucareros, siendo Veracruz el principal productor con más de 240 000 ha y 22 ingenios azucareros. La participación de producción de caña de azúcar en el PIB nacional es de 0.5 % (UNC, 2007).

Uno de los retos que enfrenta la industria azucarera es aumentar su productividad disminuyendo costos de producción para hacerse más competitiva, por lo cuál es necesaria la introducción de los adelantos científicos y técnicos en la agricultura cañera.

El cultivo *in vitro* de caña de azúcar a nivel comercial se realiza tradicionalmente con trozos de tallo, conteniendo yemas axilares y una franja de primordios radicales, surgiendo de aquí una nueva planta. Sin embargo, la brotación de las yemas no está asegurada, ya que depende de factores ambientales como lo son: temperatura, humedad, aireación y precipitación, entre otros, que en un momento dado no pueden ser controlados. Uno de los inconvenientes es que la mayoría de los productores cañeros utilizan caña semilla (trozo de tallo) sin tratamiento (hidrotermoterapia) y la falta de

dicho tratamiento la hace susceptible a enfermedades que incluso pueden afectar su propagación.

Debido al incremento en la siembra de caña semilla, en los últimos años se ha podido observar una escasez de materiales élites aptos para lograr plantaciones sanas y productivas. Para abatir esta escasez, una opción viable la representa la micropropagación *in vitro* de plantas que permite la generación de nuevos individuos en forma acelerada, con pureza genética y excelente estado fitosanitario.

En la actualidad existen numerosos medios de cultivo utilizados para la micropropagación de caña de azúcar, los cuales se basan principalmente en las sales de Murashigue y Skoog (MS) y varían sus concentraciones de sales minerales, elementos orgánicos y fitohormonas.

En el cultivo *in vitro* de las plantas, los reguladores del crecimiento vegetal, especialmente las auxinas y citocininas, tienen funciones importantes. La auxina ácido indol acético (AIA) se añaden en concentraciones de 0.01-10 mg L⁻¹ en el medio de cultivo. El AIA generalmente produce elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhibición de brotes axilares y adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. La citocinina kinetina (KIN) se utiliza para estimular el crecimiento y desarrollo además sirven para estimular la división celular. La KIN en concentraciones elevadas (1.0-10 mg L⁻¹) induce la formación de brotes adventicios e inhibe la formación de raíces y retarda el envejecimiento (Pierik, 1990).

El impacto de las relaciones hormonales en el medio de cultivo sobre el crecimiento y el estatus nutrimental en caña de azúcar es un área que no se ha investigado, por lo que se busca realizar pesquisas en este respecto.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. Generalidades de la caña de azúcar

2.1.1 Características de la caña de azúcar.

Taxonómicamente la caña de azúcar se ha clasificado dentro del Reino: Vegetal; Subreino: Carmobionta; División: Magnoliophyta; Clase: Liliatae; Orden: Poales; Familia: Poaceae (Gramineae); Tribu: Androponeae; Subtribu: Saccarinea; Género: *Saccharum*; Especies: *officinarum* L., *robustum* Brandes, *spontaneum* L., *barbari* Jese, *sinense* Roxb, y *edule* Hassak. (Salgado *et al.*, 2003).

La caña de azúcar forma cepas constituidas por aglomeración que se originan de las yemas del material vegetativo de siembra y de las yemas de los nuevos brotes subterráneos (Humbert, 1971). El tallo está formado internamente por un tejido parenquimatoso desmenuzado en el cual se encuentra embebidas numerosas haces vasculares, con una capa epidérmica dura en su exterior que sirve para ayudar a sostener el tallo y proteger las células subyacentes (Ochse *et al.*, 1965). El tallo está formado por nudos y entrenudos (Figura 1), en los que se almacenan los azúcares (Salgado *et al.*, 2003). Se clasifican en cortos, medianos y largos (Celis, 1978).

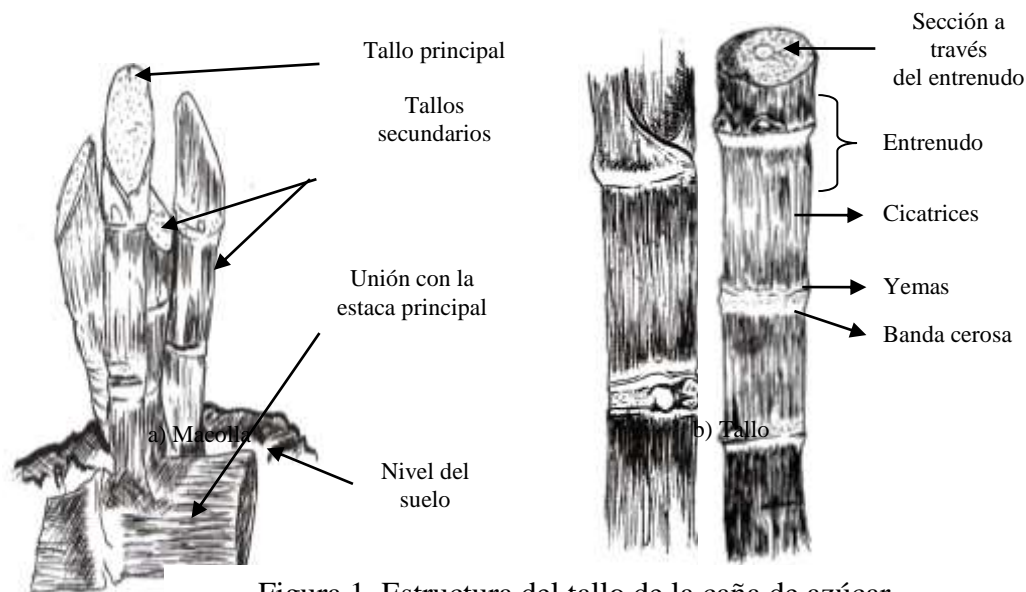


Figura 1. Estructura del tallo de la caña de azúcar.

Los nudos se desarrollan aproximadamente cada veinte días (Salgado *et al.*, 2003) y están separados por entrenudos, poseen un anillo de crecimiento que se encuentra en el tejido meristemático que origina el alargamiento del entrenudo. La forma de los entrenudos es muy variada: puede ser cilíndrica, conoidal o en forma de barril y de color verde, amarillo, morado, café rojizo o con franjas y combinaciones de ellos. En ocasiones una capa sedosa puede darle una tonalidad blanquecina (Celis, 1978).

La banda de las raíces se presenta arriba de los nudos con manchas en número variable (de 1 a 3). En estas manchas se localiza el tejido meristemático que origina raíces en las semillas llamadas primordiales, aunque las raíces primarias emitidas por las semillas tienen también su origen en estas zonas (Celis, 1978).

Las yemas están ocultas en forma parcial o total por la base de las hojas, por su forma pueden ser planas o abultadas o combinarse con otras (Velásquez *et al.*, 1988). La germinación de las yemas consiste en el paso de órganos primordiales latentes en estado activo de crecimiento y desarrollo. Esto involucra fenómenos bioquímicos complejos caracterizados principalmente por la transformación de reservas nutritivas y la actividad de enzimas y fitohormonas como auxinas (Salgado *et al.*, 2003).

Las hojas se originan de los nudos. Son alternas, alargadas y formadas por la vaina y el limbo. Están unidas por una articulación. La vaina es tubular y envolvente, más ancha en su borde (Figura 2). El limbo tiene una nervadura central prominente y los bordes ligeramente dentados. La articulación entre la banda y el limbo se llama collar y posee lígulas y aurículas. El índice de área foliar es de ocho, el cual se logra alrededor de seis a ocho meses después de la siembra (Salgado *et al.*, 2003). Si se observa desde arriba, la nervadura central contrasta fuertemente con el resto de la hoja ya que es hundida y tiene color blanco; el envés es de sección transversal convexa y de color verde. La forma de la hoja y su firmeza determinan el hábito de la variedad (Ochse, 1965). La parte inferior o base envolvente, con frecuencia envuelve al tallo en una parte que comprende varios entrenudos antes de terminar en la parte donde se acumula el agua. En el extremo de la envoltura basal tiene una o dos aurículas que junto con la

lígula a lo largo del margen interior tienen una forma típica en una determinada variedad, constituyendo un medio valioso para su identificación. Las partes exteriores de la base están cubiertas de pelos. La longevidad de su hoja es corta (Ochse, 1965).

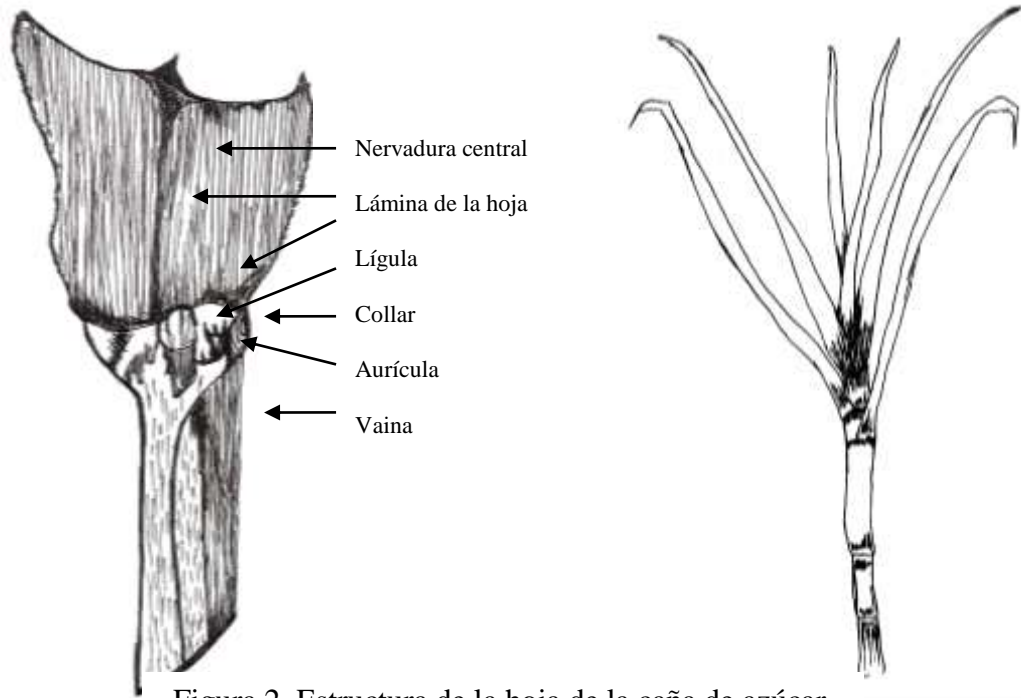


Figura 2. Estructura de la hoja de la caña de azúcar.

La caña de azúcar florece en climas tropicales. La respuesta a la floración difiere según el genotipo, temperatura, fotoperiodo, humedad, suelo y nutrición (Poehlmon y Allen, 2003). La floración ocurre cuando una planta alcanza cierta etapa de su desarrollo y su punto de crecimiento puede, bajo ciertas condiciones ambientales, cambiar de la etapa vegetativa a la productiva (Hernández, 2004). La floración es un carácter indeseable en especies comerciales ya que resulta en una maduración rápida y reduce el rendimiento total de azúcar (Poehlmon, 2003). La inflorescencia es un panícula sedosa, abierta y ramificada (Figura 3) (Rodríguez, 1992). Está constituida por un eje principal al cual se insertan los ejes laterales primarios (Velásquez *et al.*, 1988). Las flores están dispuestas por pares; en cada articulación, una es sésil y la otra pedunculada (Salgado *et al.*, 2003). La inflorescencia está rodeada por varios pelos que le dan un aspecto sedoso (Velásquez *et al.*, 1988).

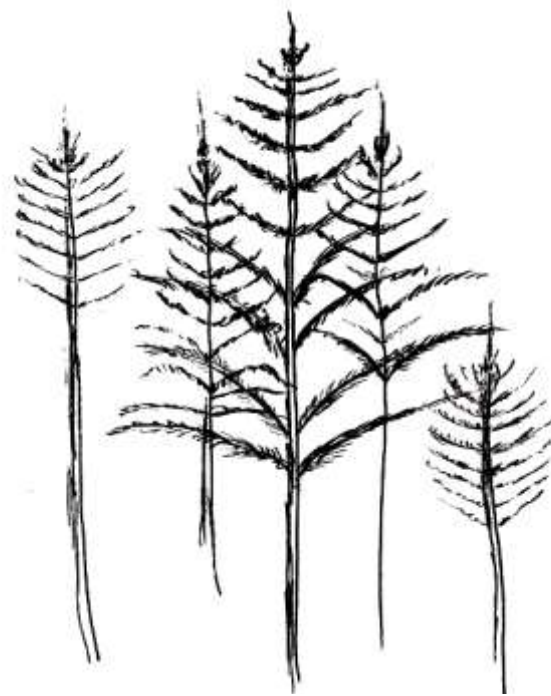


Figura 3. Aspecto de la inflorescencia de la caña de azúcar.

La caña posee dos tipos de raíces; las primordiales que se originan en los entrenudos, no manifiestan polaridad y son delgadas; su función termina con la germinación de la semilla y con la aparición de raíces permanentes (Figura 4). Estas últimas son emitidas por el macollo; son gruesas y tienen cofia sirviendo a la planta para toda la vida. Cada macollo tiene su raíz propia pero existen entre lazos que forman un rizoma (Celis, 1978).

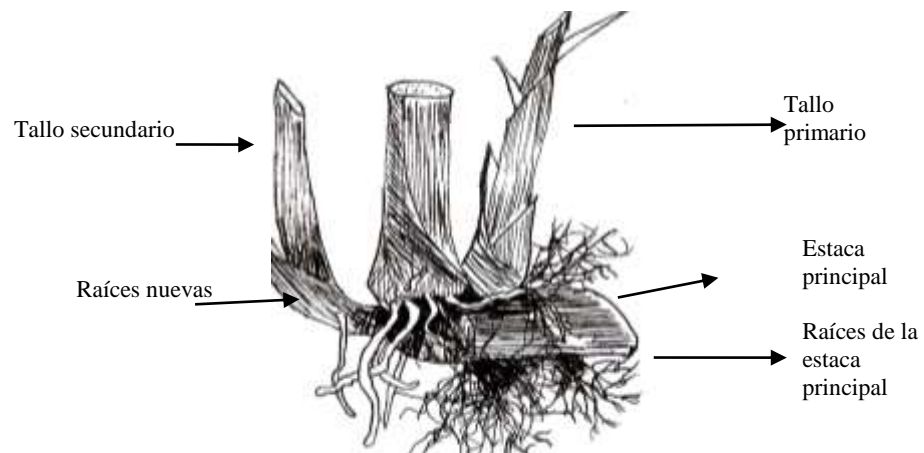


Figura 4. Sistema radical de la caña de azúcar.

2.1.2 Importancia económica

Una de las fuentes principales de alimentación para el hombre es la caña de azúcar, además de que se utilizan ampliamente los productos derivados a partir de diferentes procesos industriales de este cultivo.

En el mundo se destinan unas 15 000 000 ha a estas plantaciones, siendo los principales países productores Brasil, La India, China, Tailandia, Pakistán y México (Cuadro 1) (Suárez y Marín, 2003; FAO, 2005; UNC, 2007).

Cuadro 1. Principales países productores de caña de azúcar.

País	Producción de caña de azúcar/1000	Superficie cultivada/1000
Brasil	420,121	5,767
India	232,320	3,750
China	92,130	1,414
Tailandia	49,572	1,066
Pakistán	47,244	966
México	45,126	650
Colombia	39,849	432
Australia	38,246	420
Filipinas	31,000	405
Estados Unidos	25,804	387
Argentina	19,300	305
Cuba	12,500	400
Venezuela	8,800	130

Fuente: FAO, 2005; UNC, 2007

Durante la zafra 2004-2005, el total de la caña molida fue de 50.9 millones de toneladas, con un rendimiento por hectárea en campo de 77.5 toneladas. Con una producción de azúcar de 5.8 millones de toneladas, el rendimiento en fábrica fue de 11.4% (UNC, 2007). El consumo nacional de azúcar de caña es de 44 kilogramos por habitante, convirtiéndose en un producto de gran demanda en la población. México

ocupa el 7º lugar en producción de azúcar y el mismo lugar en consumo de azúcar, tiene el 4º lugar en producción en campo de caña de azúcar y el 5º lugar en producción por hectárea (UNC, 2007).

La agroindustria del azúcar y el proceso primario de producción del cultivo en México constituyen una importante fuente de empleo. La producción de caña de azúcar en el país genera 440 mil empleos directos y 2.5 millones de empleos indirectos. Estas cifras indican la importancia social y económica del cultivo. Se destaca que el 80 % de los empleos están ocupados por productores y cortadores (UNC, 2007).

Con relación a su estructura productiva según el tipo de tenencia de la tierra, predomina la producción minifundista, donde el 79 % de los productores son ejidatarios y poseen el 68 % de la superficie cañera, el 64 % de la superficie zafrable está situada en predios cañeros que tienen una extensión media de 3.9 ha lo que incrementa el costo del cultivo.

En el estado de Veracruz se localizan 22 ingenios azucareros en un área de influencia en conjunto de 240 mil ha y 2 120 063 toneladas de azúcar producidas en la zafra 2005/2006 (UNC, 2007).

2.1.3 Origen y distribución

El inicio del cultivo de la caña de azúcar se remonta 2500 años antes de nuestra era. Se sabe que esta especie ya se cultivaba en la India en el año 400 A. C. y se procesaba por métodos primitivos (Ochse, 1965). La caña de azúcar original (*Saccharum officinarum* L.) evolucionó en Papua Nueva Guinea a partir de las razas de la especie silvestre (*Saccharum spontaneum* L.) originaria de esta región (Salgado *et al.*, 2003).

Pero la caña de azúcar y el arte de obtener su azúcar fueron llevados en un principio de la India a China así como Arabia y de este país a la costa del Mediterráneo en donde se desarrolló una industria azucarera próspera. En el siglo VIII D.C., fue

llevada a España por los árabes donde se cultivaba principalmente en las tierras costeras de Málaga y Granada, región que aún mantiene esta actividad. Posteriormente los españoles llevaron la planta a las Indias Occidentales, en muchas de cuyas zonas el clima era más favorable que en la Península, por lo que casi se abandonó el cultivo en esta (National Parks Board, 2006).

En el siglo XVI la caña de azúcar se había producido en los lugares que se sembró (Ochse, 1965). La selección implicó una fuerte presión hacia el aumento de la azúcar, la selección fue efectuada por las comunidades al utilizar la caña para masticar. La India y China son probablemente los centros de origen de la industria de la extracción de azúcar (Salgado *et al.*, 2003).

En México el cultivo de la caña de azúcar tiene una antigüedad de más de cuatro siglos y medio. Los primeros clones fueron traídos de Cuba en 1519 por Hernán Cortés quien la estableció en San Andrés Tuxtla, Ver. Actualmente es una de las actividades de mayor importancia en la economía del país (Salgado *et al.*, 2003).

La agroindustria de la caña de azúcar tiene un efecto socioeconómico en 12 millones de personas y 227 municipios donde se generan 440 mil empleos directos y 2.5 millones de empleos indirectos. Actualmente México ocupa el 4º lugar a nivel mundial en el consumo de azúcar con 44 kilogramos consumidos anualmente por habitante, a nivel nacional, el consumo de azúcar y edulcorantes es de 5.4 millones de toneladas.

2.2. Métodos de propagación *in vivo* de la caña de azúcar

La propagación *in vivo* de la caña de azúcar se efectúa de dos formas y dependiendo del objetivo que se persiga se puede utilizar uno de los siguientes tipos:

2.2.1. Propagación sexual

Si el objetivo es obtener nuevas variedades, a través de cruces entre clones se puede utilizar la semilla botánica o verdadera, que es el producto del desarrollo del óvulo fecundado. Esta semilla se hace germinar y sobre las plantas resultantes se practica la selección de las que reúnen las características deseadas.

Obtenida por cruzamiento intervarietal, por mucho tiempo se pensó que la caña de azúcar no producía semilla. Esto se debía a que la única variedad cultivada en el nuevo mundo, por más de 250 años era androesteril. Sin embargo, en 1885 Solwedel logró propagar *Saccharum spontaneum* por semilla rompiendo así este tabú (Salgado *et al.*, 2003).

La producción de semilla botánica o semilla verdadera está enfocada únicamente para trabajos de mejoramiento genético y de interés científico. El mejoramiento tradicional del cultivo se ha realizado mediante la producción de híbridos. No obstante, este procedimiento requiere de 10 a 15 años y variedades de comprobada adaptabilidad y rendimiento; obtenidas a través de este proceso, han mostrado con el tiempo susceptibilidad a enfermedades introducidas al país (González *et al.*, 1990).

2.2.2. Propagación asexual

Para producir el cultivo de caña de azúcar a nivel comercial se plantan trozos de tallo (con 3 a 4 yemas). Cada nudo posee una yema axilar y una franja de primordios radicales, surgiendo de aquí una nueva planta.

La brotación de las yemas es el paso de los órganos primordios, latentes en la yema al estado activo de crecimiento y desarrollo. Esto involucra fenómenos bioquímicos complejos caracterizados principalmente por la transformación de las reservas nutritivas y la actividad de enzimas y auxinas.

Habiendo buenas condiciones de humedad, temperatura y buen nivel de nitrógeno, un trozo brota, esto es, sus yemas se desarrollan en un nuevo tallo y sus primordios radiculares, en raíces. Al principio la yema que empieza a crecer depende del trozo del tallo y sus raíces para obtener nutrientes y agua, pero en condiciones favorables desarrolla su propio sistema radical después de transcurridas unas tres semanas. Las raíces del brote nacen en los nudos ubicados bajo tierra, mientras que las yemas axilares que poseen éstos producen los macollos. Se ha contabilizado que una yema de este tipo puede producir hasta 144 tallos.

Para siembras comerciales en las que la propagación es vegetativa, se utilizan trozos de tallos de la propia caña de azúcar que contengan yemas viables, los cuales se tienden en el fondo del surco y se tapan, para dar origen a la primera cosecha o plantilla, el sistema radicular tiene yemas subterráneas que producen otras cosechas denominadas socas (IMPA, 1975).

2.2.2.1. Factores que afectan la brotación de las yemas

Variedad. Se ha observado que en algunas variedades la brotación de las yemas se da antes que el desarrollo de las raíces; y en otras ocurre lo contrario. Tales diferencias son de origen genético (Ortiz, 1978).

Estado nutricional. Cañas nutridas de forma adecuada con nitrógeno, pueden aumentar hasta 25 % la brotación y reducir el tiempo de emergencia, esto porque el nitrógeno inhibe la dominancia apical favoreciendo la brotación de las yemas laterales.

Edad de la yema en el tallo. Las yemas más jóvenes tienen mayor capacidad de brotación, así la brotación decrece de la punta hacia la base del tallo.

Longitud de los trozos de caña para siembra. La longitud del trozo de caña debe ser tal que contenga tres yemas, ya que en trozos de mayor longitud se presenta la

dominancia apical, donde las yemas más jóvenes germinan más rápido inhibiendo la germinación de las yemas viejas.

Intervalo de tiempo entre corte y siembra. La brotación de las yemas mejora cuando los trozos de punta de caña quedan expuestos a la evaporación durante unos 5 o 6 días en condiciones de baja humedad y alta temperatura (32 a 36 °C).

Presencia de la vaina de la hoja. La vaina ejerce un efecto favorable protegiendo las yemas de la evaporación en la caña que está en desarrollo, pero, si se deja en el trozo resulta perjudicial ya que impide el contacto directo del trozo de caña con la humedad del suelo y ejerce un efecto mecánico comprimiendo las yemas con lo que impide su desarrollo normal.

Temperatura. La temperatura es uno de los factores más importantes que regulan el proceso de brotación. Temperatura óptima es de 30 °C.

Humedad del suelo. Esta debe ser igual o menor de capacidad de campo.

Aireación del suelo. Suelos de textura fina con excesos de humedad provocan brotación irregular. Por lo que es necesario realizar drenaje parcelario, si el contenido de arcilla es mayor de 35 %.

Tratamiento de la semilla. Se recomienda tratar la semilla con agua caliente durante 20 minutos a 52 °C, para prevenir ciertas enfermedades. Este tratamiento, además, induce la rápida brotación de las yemas y un crecimiento precoz de los nuevos tallos.

2.3. Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente *in vitro* de forma que se

puedan controlar los factores ambiente y nutrición. Se utiliza el sistema de producción *in vitro* que requiere instalaciones de tipo laboratorio y técnicas asépticas similares a las utilizadas para cultivar hongos, bacterias y otros microorganismos (Núñez, 2004).

Esta técnica se basa en la teoría de totipotencia celular que es, la capacidad potencial que tiene una célula de regenerar una planta completa. La micropropagación se inicia con un pequeña escisión de la planta (explante) libre de microorganismos contaminantes obteniendo así, plantas libres de plagas y enfermedades, producción durante todo el año, plantas idénticas a la planta madre y homogeneidad y estabilidad genética. También presenta ciertas desventajas como problemas de contaminación causadas por agentes patógenos endógenos o por falta de asepsia durante la manipulación (Núñez, 2004).

2.3.1. Etapas de la micropropagación

Murashige y Skoog (1962) propone tres etapas de propagación, las cuales en algunos casos tanto para investigación como para comercialización, no se siguen secuencialmente sin embargo, estas etapas son una guía para el manejo de los materiales. En la actualidad se reconoce una etapa adicional en la cual las plantas son transferidas al ambiente *in vivo* y otro anterior al cultivo *in vitro* al cual se ha acordado llamar etapa 0 (Debergh y Maene 1981).

Etapa 0. Pretratamiento de la planta madre

Se debe conocer toda la fenología de la planta madre, además de mantenerla en un estado juvenil, fuerte y vigorosa. Para ello, se le da el manejo necesario como podas, humedad y fotoperiodos, se le debe agregar nutrientes, sujetarla a un estricto programa fitosanitario que consiste en, una mezcla de fertilizantes comerciales y fungicidas aplicados en periodos regulares antes del establecimiento aséptico (Núñez, 2004).

Etapa I. Establecimiento aséptico

La función de esta etapa es establecer un explante estéril en un medio de cultivo. El explante puede ser cualquier tejido ya sea raíz, tallo, flor, semilla, células u hojas. En general, los tejidos más jóvenes como las puntas de los brotes terminales o axilares se regeneran mejor que otros tejidos del tallo más viejos y maduros. Esta etapa de establecimiento usualmente dura de cuatro a seis semanas. Durante este periodo el explante tiende a formar una estructura pequeña foliosa tal vez de un centímetro de largo con varias ramas axilares. El problema en esta etapa es la contaminación por microorganismos. Para el éxito de esta etapa se debe cuidar la selección del explante, la eliminación de contaminantes del mismo, así como las condiciones del cultivo, luz, temperatura y selección del sostén del explante. Otro problema que se presenta es la oxidación del explante y puede ser a causa de la especie ya que las especies tropicales son las más susceptibles. Algunos antioxidantes usados comúnmente son el ácido cítrico, el ácido ascórbico y carbón activado (Núñez, 2004).

Etapa II. Multiplicación

Se incrementa el número de propágulos o brotes. Los explantes expandidos de la etapa I se cortan y los propágulos se vuelven a cultivar en un nuevo medio. Una vez obtenida la respuesta fisiológica de un explante mediante la formación de algún brote es necesario pasarlo a otro medio de cultivo para estimar su multiplicación, aquí es donde se implementan los métodos de micropropagación para tratar de tener la tasa de multiplicación elevada y en un menor tiempo de incubación. Por lo regular el período de incubación que se ha registrado en diferentes especies varía de cuatro a ocho semanas. La multiplicación se repite con intervalos regulares. En etapas consecutivas de multiplicación, las tasas pueden variar de 5-50 brotes. La multiplicación de la especie responde a la estructura del medio y el tipo de reguladores de crecimiento y su concentración (Núñez, 2004).

Etapa III. Alargamiento y enraizamiento

En esta etapa se manejan brotes que no enraízan en la etapa de multiplicación. Los brotes que se deben ocupar deben tener un tamaño de tres a cuatro centímetros de longitud, se siembran en forma individual con un periodo de enraizamiento de dos a cuatro semanas dependiendo de la especie, del medio de cultivo, de la concentración de citocininas que se deben eliminar y ocupar alguna auxina (Núñez, 2004).

Etapa IV. Aclimatación

Esta fase es una de las más delicadas ya que consiste en pasar las plantas de *in vitro* a *in vivo*. Para ello debe tenerse cuidado a la respuesta de las plantas a un brusco cambio de condiciones heterótrofas o autótrofas, dicho proceso se lleva a cabo en un invernadero equipado para adaptar plántulas en donde se controlan la temperatura, humedad relativa, intensidad lumínica, riego y nutrición (Núñez, 2004).

2.3.2 Factores que influyen en la micropropagación

Son muchos los factores que afectan la capacidad de supervivencia de los explantes, su establecimiento, su habilidad para reproducirse, la capacidad de regeneración, el logro de los objetivos al iniciar el trabajo de micropropagación. Aunque no pueden darse reglas generales sobre estos factores, si se puede hablar de una tendencia en el comportamiento del cultivo *in vitro* (Montoya y Luz, 1991). El cultivo de tejidos en general es un sistema de “detalles”, la mayoría de las veces no se puede ni explotar ni trabajar con aproximaciones de los factores físicos y químicos que intervienen para un determinado propósito. Los cambios en las dosificaciones del medio, del fotoperiodo, de la temperatura y del pH entre otras cosas, pueden ocasionar alteraciones morfológicas, retraso de crecimiento o toxicidad (Hartmann y Kester, 1998).

2.3.2.1 Medios de cultivo

Los componentes del medio de cultivo incluyen: agua, sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes), carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, suplementos no definidos y agentes gelificantes principalmente. Los medios de cultivo están constituidos en su mayor parte por agua. En su preparación es necesario utilizar agua destilada (López, 1990).

Los compuestos inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si se escasean estos elementos, aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento (Hartmann y Kester, 1998). El nitrógeno (N) es componente de aminoácidos (proteínas), vitaminas y ácidos nucleicos. Mientras la planta está en crecimiento activo, necesita gran cantidad de N en cantidad adecuada según la especie de planta. En concentraciones altas, el N promueve el enraizamiento y en bajas el desarrollo de callo (López, 1990). El fósforo (P) es uno de los elementos necesarios para el metabolismo de las plantas, es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía, se absorbe en forma de PO_4^+ . El potasio iónico (K) tiene relación con la diferenciación de órganos. El calcio (Ca) es componente de la pared celular. El magnesio (Mg) y el hierro (Fe) son componentes importantes de la molécula de clorofila, además de que el hierro se presenta en forma de quelato (Fe-EDTA) en los medios de cultivo (Usui *et al.*, 1996). Los micronutrientes son compuestos que la planta requiere en menor cantidad (5 mmoles L^{-1}), pero no por ello son menos importantes. Estos son el manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y Boro (B). Los cinco ayudan a la síntesis de clorofila y al funcionamiento de cloroplastos (López, 1990).

Los carbohidratos son necesarios en las células vivas como fuente de energía y esqueletos de carbono para los procesos biosintéticos (Romano *et al.*, 1995). En cultivo de tejidos vegetales es necesario el suministro de carbohidratos. La sacarosa es el azúcar empleado en los medios de cultivo en concentración que varía de 1 a 5 % (Pierik, 1990).

Las vitaminas más empleadas en el cultivo *in vitro* son la tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆), ácido nicotínico, inositol (mio-inositol), ácido fólico (vitamina M), riboflavina (vitamina B₂), las cuales son necesarias para llevar a cabo reacciones catalíticas en el metabolismo (Pierik, 1990).

Los aminoácidos promueven la producción y diferenciación de células y tejidos. Cuando se adiciona algunas veces ocurren inhibiciones en el crecimiento de las plántulas. Por lo que, se deben incluir combinaciones de ellos (López, 1990).

En el cultivo *in vitro* de las plantas, los reguladores del crecimiento, especialmente las auxinas y citocininas, tienen funciones importantes.

Las auxinas como el AIA se añaden en concentraciones de 0.01-10 mg L⁻¹ en el medio. Las auxinas sintéticas y relativamente más activas (AIB, ANA, 2,4-D) se utilizan en concentraciones de 0.001-10 mg L⁻¹. Estas fitohormonas generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de brotes axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990).

Las citocininas se utilizan para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo las más comunes: kinetina, cinetina, bancilaminopurina (BAP) y 2 isopentiladenina (2iP). Sirven para estimular la división celular. En concentraciones elevadas (1-10 mg L⁻¹) inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces y retardan el envejecimiento (Pierik, 1990).

Como suplementos no definidos se utiliza principalmente el agua de coco, caseína hidrolizada y extracto de malta. Estos compuestos inducen diferenciación y la producción de células y tejidos; sin embargo, debido a que son compuestos muy complejos, inestables y no presentan homogeneidad son poco utilizados (Pierik, 1990).

El agar-agar es un producto que se obtiene de ciertas algas rojas, usado en la preparación de medios de cultivo en condición sólida o semisólida, la concentración a la

que se usa es 0.6 a 0.8 %, es en esencia biológicamente inerte (Hartmann y Kester 1998).

Otro agente gelificante es el Phytigel, que se usa en una concentración más baja con respecto al agar, a un cuarto de la misma (Pierik, 1990).

2.3.2.2. Genotipo

La capacidad de regeneración en el reino vegetal es muy variada. Las dicotiledóneas generalmente se regeneran mejor que las monocotiledóneas, teniendo las gimnospermas una capacidad muy limitada de regeneración (excepto cuando están en su estado juvenil). Entre las dicotiledóneas se regeneran fácilmente las *Solanáceas*, *Begoniáceas*, *Crasuláceas*, *Gesneriáceas* y *Crucíferas*.

2.3.2.3. Edad de la planta

Los tejidos embrionarios generalmente tienen una alta capacidad regenerativa, y por ejemplo, en el caso de los cereales, los embriones y las semillas se utilizan frecuentemente como material experimental para el cultivo de tejidos. Conforme una planta envejece, su capacidad regenerativa suele disminuir, y por eso se tiende a utilizar material procedente de plantas juveniles, mejor que de plantas adultas, especialmente en el caso de árboles y arbustos. A veces a través de repicados repetidos de ápices del vástago o especialmente meristemos, un meristemo adulto en forma gradual adquiere características juveniles. Este rejuvenecimiento se traduce en un incremento de la división celular y la regeneración (Hackett, 1985).

2.3.2.4. Edad del órgano o tejido

Los tejidos jóvenes no lignificados, por lo general son más apropiados para el cultivo que los tejidos viejos y leñosos. Conforme envejece el órgano a partir del cual se

toma el explante, el número de divisiones celulares y la capacidad de regeneración disminuyen.

2.3.2. 5. Estado fisiológico

Este tiene un fuerte efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro*. En general los fragmentos de plantas en estado vegetativo, regeneran *in vitro* con más facilidad que los fragmentos de plantas en estado generativo. Los fragmentos de plantas juveniles regeneran con más facilidad que los procedentes de plantas adultas. Las yemas (especialmente de árboles y arbustos), que se encuentran todavía en estado de reposo (final de otoño o principio del invierno), son más difíciles de cultivar *in vitro* que las que proceden de plantas que ya no están durmientes (tomadas en primavera, inmediatamente antes del inicio de su crecimiento). Es muy importante considerar la dormancia cuando se trabaja con semillas.

2.3.2.6. Estado sanitario

Existen más probabilidades de éxito en el cultivo *in vitro*, si la planta tiene un buen estado de salud en el momento del aislamiento. Si se debe elegir entre individuos de un mismo clon, se deben tomar los más sanos como material experimental, ya que esto repercute sobre el porcentaje de infección después del aislamiento.

2.3.2.7. Efecto del tiempo atmosférico

Si los explantes se obtienen de material vegetal, procedente de plantas cultivadas en el campo, se pueden encontrar diferencias debidas a las condiciones meteorológicas como por ejemplo un invierno riguroso, que facilita la ruptura de la dormancia; un verano seco, responsable de un crecimiento pobre si ha faltado el agua; luz insuficiente durante el período de crecimiento, que puede significar una menor cantidad de sustancias de reserva.

2.3.2.8. Condiciones de crecimiento

Si el material ha sido cultivado bajo condiciones naturales de duración e intensidad luminosa, reaccionará de modo diferente al que haya crecido en un invernadero. En general, el material de invernadero (más etiolado) regenera con más facilidad que el procedente del exterior.

2.3.2.9. Posición del explante dentro del frasco

Topófisis es el fenómeno que explica la influencia de la posición del explante en el vegetal sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* después del aislamiento. Por ejemplo, cuanto más alto es el vástago aislado de un árbol, menor es la probabilidad de que se formen raíces adventicias ya que las porciones más altas son más adultas que las más bajas.

2.3.2.10. Tamaño del explante

En términos generales se puede decir que es mucho más difícil inducir el crecimiento en estructuras muy pequeñas como células, agregados de células, y meristemos, que en estructuras más grandes, como explante de hoja, tallo o tubérculo. Cada fracción aislada de una planta tiene su propia porción de reservas y hormonas, y es obvio que cuanto mayor sea el fragmento vegetal, más fácil es inducir el crecimiento y regeneración. Las fracciones de plantas que contienen grandes cantidades de reservas alimenticias como tubérculos, bulbos, etc., generalmente se regeneran más fácilmente *in vitro*, que aquellas que contienen menos reservas. Cuando se aíslan explantes grandes, la adición de nutrimentos (azúcares, minerales) y reguladores puede tener menos efecto. Cuando se obtienen explante, se debería tener en cuenta que la proporción entre superficie herida e intacta, puede influir en la regeneración.

2.3.2.11. Luz

Tanto la duración diurna (fotoperíodo) como la calidad de la luz (longitud de onda e intensidad) son importantes, ya que influye en la síntesis y la acumulación de almidón y en las hormonas endógenas, entre otras sustancias (Montoya, 1991). El desarrollo y crecimiento de las plantas depende en gran medida de la radiación, calidad y duración de la luz (fotoperíodo). Esta última ya no solamente es importante para la fotosíntesis, sino que además es un disparador y modulador de las respuestas morfogénicas. En general las plantas tienden a adaptarse a la disponibilidad de luz cambiando la composición de las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Milivojevic y Tyszkiewicz, 1992). Generalmente las especies tropicales se utilizan 1000 luxes de intensidad lumínica por 16 horas diarias con lámparas de amplio espectro lo cual sería una combinación apropiada (Núñez, 2004).

2.3.2.12. Temperatura

Para la propagación de la mayoría de las especies vegetales, la temperatura de incubación fluctúa entre 24 y 28 °C. La variación en los regímenes de temperatura ha resultado ventajosa únicamente en un reducido número de especies (Chee y Pool, 1982). En algunas ocasiones es importante considerar la procedencia de la especie, si es de clima cálido frío, o tomar en cuenta que la temperatura mantenida en los recipientes cerrados tiende a ser superior a la del cuarto climatizado (Usui *et al.*, 1996).

2.3.2.13. Contaminación

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales en el mundo, pues produce cuantiosas pérdidas de material tanto en la micropropagación comercial como en los trabajos de investigación. La misma puede tener dos orígenes: el primero se relaciona con microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos), mientras que el segundo lo provocan fallas en los procedimientos de laboratorio.

Los contaminantes más frecuentes *in vitro* son los hongos, bacterias y levaduras, denominados por Herman en 1913 vitropatógenos, que en muchos casos no son patógenos en condiciones de campo. Su efecto es muy dañino, ya que compiten con el explante por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la eliminación al medio de metabolitos tóxicos. Las bacterias son los contaminantes más comunes y ocasionan serios problemas porque pueden ser sistémicas así como difíciles de detectar y de eliminar. Estos microorganismos escapan a los efectos de los esterilizantes superficiales y pueden ser inter o intracelulares. Entre los últimos, se encuentran virus, viroides y muchos géneros bacterianos como, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Su distribución puede ser localizada o sistémica, por xilema o por floema. Estos contaminantes no se manifiestan en los primeros subcultivos, ya que la alta presión osmótica, el pH y ciertas hormonas de los medios de cultivo, pueden inhibir su crecimiento. Debido a este efecto inhibitorio, muchos microorganismos requieren un periodo de adaptación a las nuevas condiciones antes de manifestar su presencia, lo cual se da por lo general en la fase de multiplicación. El tipo de cultivo (anual o perenne), la forma de propagación (sexual o asexual) y las condiciones climáticas influyen en la gravedad de las contaminaciones.

Los cultivos perennes que se multiplican asexualmente, como la caña de azúcar, y los climas tropicales favorecen la acumulación de contaminantes. En esta especie, se ha determinado una abundante flora bacteriana en todos los tejidos de la planta y en los haces conductores. Bellone *et al.* (1995) han demostrado que la caña de azúcar puede ser colonizada endofíticamente por bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Herbaspirillum* y *Azospirillum*, los cuales se encuentran en la parte aérea de la planta, incluido el ápice. Estas bacterias se introducen en el cultivo de tejidos y se propagan con el material vegetal, convirtiéndose, luego, en contaminantes de los cultivos *in vitro*. En la micropropagación de la caña de azúcar, la contaminación bacteriana produce grandes pérdidas directas e indirectas como: reducción de la tasa de multiplicación, inhibición del enraizamiento y muerte de plantas en todas las etapas del proceso, trabajos realizados en Cuba demostraron que en la fase de establecimiento *in vitro* las bacterias

son responsables del 15 al 34 % de las pérdidas producidas por microorganismos. De estas pérdidas, el 82 % se deben a géneros bacterianos que son patógenos sistémicos o saprofitos asociados al cultivo. Esto demuestra que fueron introducidos con el explante original. Para la micropropagación de la caña de azúcar, en la etapa de multiplicación se determinó un porcentaje de contaminación bacteriana del 17.4 %.

2.3.2.14. Otros factores

El material con que se sella el recipiente puede influir en el intercambio gaseoso (aluminio, plástico o parafilm) así como el tipo de flama (de gas o alcohol). Los gases que participan más en este proceso son el oxígeno, el bióxido de carbono y el etileno, que pueden o no favorecer el desarrollo de tallos o brotes, según la especie. Finalmente el subcultivo puede mermar al potencial morfogénico por fragmentación excesiva de las áreas especializadas, por reducción de los niveles endógenos de hormonas o por la acumulación de anormalidades (Usui *et al.*, 1996).

2.3.3. Ventajas de la micropropagación

La micropropagación ha mostrado importantes ventajas en algunas especies, al compararse con los sistemas convencionales de propagación (Orozco, 1993)

Según Pierik (1990) las que se muestran a continuación son las más importantes:

- El número de plantas derivadas por genotipo, puede ser incrementado aceleradamente.
- Es posible multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y por tiempos económicamente costeadles.
- Permite multiplicar rápidamente una variedad que esté en vías de extinción.

2.4. Cultivo *in vitro* de la caña de azúcar

Los primeros trabajos sobre citocultivos en caña de azúcar fueron realizados por Nickell (1965), quien aisló células y tejido parenquimático de 22 variedades, demostrando que se podían mantener casi indefinidamente; los objetivos del trabajo fueron determinar los clones de caña de azúcar que podían ser aislados, y si las características morfológicas y fisiológicas diferían entre sí. Posteriormente enlista 14 áreas principales con valor potencial para ser aplicadas a caña de azúcar.

Heinz and Mee (1969) lograron la inducción de callos a partir de tejido parenquimático de ápices de tallo, hojas e inflorescencias, usando un medio basal compuesto de sales minerales suplementado con endospermo de coco al 10 % por volumen y 2, 4-D. Los callos fueron transferidos al medio basal sin 2, 4-D, lo que indujo la diferenciación de plantas. Heinz concluye diferencias morfológicas en las poblaciones así obtenidas en relación a la planta madre.

Barba and Nickell (1969) realizó un estudio sobre organogénesis en caña de azúcar, con el objeto de demostrar la capacidad de regeneración de plántulas, utilizó dos medios de cultivo y cuatro variedades comerciales, de las que obtuvo callos manteniéndolos durante cinco años y observó que la capacidad de diferenciación de tallos fue disminuyendo con el tiempo, respuesta aparentemente irreversible, pero no así para la diferenciación de raíz que pareció inalterable al largo tiempo de cultivo. Encontró diferentes respuestas a la acción hormonal y al medio utilizado, demostrando así que la capacidad de diferenciación de callos aislados decrece con el tiempo.

Krishnamurthi and Taskal (1974) obtuvieron plantas de caña de azúcar resistentes a algunas enfermedades, por lo que aislaron 38 subclones que fueron tratados para la reacción a la enfermedad de Fiji. Se obtuvieron cuatro subclones resistentes y uno medianamente resistente por lo que la resistencia de los subclones fue puesta a prueba por varios años en diferentes lugares y esta se mantuvo.

Nickell (1977) estudió el mejoramiento de caña de azúcar usando métodos *in vitro*, con el objetivo de manipular las poblaciones genéticamente variables para la identificación y selección de características deseables. Menciona tres áreas generales en las cuales el cultivo de células, tejidos y técnicas relacionadas son de valor potencial para el mejoramiento:

- El cultivo de ápices que permiten una rápida multiplicación clonal de plantas, las cuales son difícilmente obtenidas por los métodos tradicionales en los que se lleva mucho tiempo.
- El cultivo de embriones de híbridos de cruza deseables que no pueden desarrollarse normalmente en el seno maternal por deficiencias de nutrición, incompatibilidad y otras causas.
- Manipulación de sistemas vegetales a nivel celular que son usados en el mejoramiento asexual para o en lugar de la reproducción sexual.

El mismo autor menciona seis propuestas a nivel celular, que pueden ayudar a incrementar la diversidad genética:

1. Variación en cultivo de células, poliploidía y mosaicos cromosómicos.
2. Inducción de mutaciones
3. Inducción de poliploidía
4. Plantas haploides mediante el cultivo de polen
5. Fusión vegetativa de células
6. Transformación (transgenosis)

Los usos más promisorios en el cultivo de células de caña de azúcar para el mejoramiento y desarrollo de subclones de clones comercial deficientes en una o dos características deseables (especialmente en resistencia a enfermedades).

Payan *et al.*, (1977) realizaron un estudio sobre técnicas de propagación en caña de azúcar mediante el cultivo de tejidos y yemas, concluyeron que el tejido

parenquimatoso fue el más apto para la formación de callo. El tejido foliar fue el más eficiente para la micropropagación debido a su gran capacidad de diferenciación.

Sauvaire y Galzy (1981) en un trabajo sobre micropropagación de caña de azúcar estudiaron la influencia de una auxina: ácido naftalenacético (ANA) y una citocinina: bencilaminopurina (BAP), así como el equilibrio entre estos reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de yemas axilares y rizogénesis. Aislaron yemas axilares de la variedad Q75 y las inocularon en diversas modificaciones del medio de cultivo de Murashige and Skoog (1962) encontraron que añadiendo 6-bencilaminopurina en el medio de cultivo en una concentración 0.10 mg L^{-1} , o una combinación de ácido naftalenacético (ANA) 0.025 mg L^{-1} y 6-BAP 0.624 mg L^{-1} se obtenía mayor número de hijuelos. En presencia de 6-BAP y ANA, hubo también una fuerte inhibición de rizogénesis. Concluyeron que podían obtenerse 10 000 individuos en un año a partir de una sola planta.

Lee (1986) estudió la multiplicación de caña de azúcar por cultivo de ápices usando la variedad NA 56-79. Para ello aisló ápices de 2 mm que fueron desarrollados en siete medios de cultivo diferentes. Posteriormente se multiplicaron en un medio líquido que contenía citocinina. Los brotes desarrollados no formaron raíz, pero la etapa de multiplicación fue buena. El enraizamiento fue obtenido por medio del trasplante a fase de maceta en vermiculita, bajo condiciones de invernadero a una temperatura de 24 a 32 °C y humedad relativa de 70 a 90 %. La rizogénesis se indujo después de una semana, y la sobrevivencia fue superior al 80 %. Concluyó que las plántulas producidas mediante este método resultaron semejantes genotípicamente a las plantas madre, y más vigorosa que estas.

Carrillo (1986) investigó cómo se manifiesta la potencialidad de los tejidos de los entrenudos de la región apical del tallo de caña de azúcar, para generar cultivos celulares, su histología y ultraestructura de estos a lo largo del proceso de especialización *in situ* e *in vitro*, utilizando la variedad MEX 55-32. Encontró que el mejor gradiente internodal acrópeto determinado fue entrenudo, 190 %; entrenudo cero,

52 %; entrenado 1, 40 % entrenado 2, 80 %; entrenado 3, 5 %. Los cultivos celulares desdiferenciados y de la misma manera el patrón histológico y ultraestructura fue similar al observado en el tejido del tallo. La variación en estos resultados puede ser debido al grado de juventud de la planta, época de cosecha del espécimen y por su fenotipo.

Lee (1987) realizó un estudio en cultivo de tejidos de caña de azúcar, comparando dos métodos de micropropagación con la variedad RD 75-5275. Tomó plantas de 25 cm de altura para la escisión de meristemas y el huso foliar para el cultivo de callos, utilizando un medio de cultivo basado en las sales de Murashige y Skoog (1962) con diferentes modificaciones. Con el cultivo de meristemas en un lapso de tres meses a partir de 30 ápices obtuvo 78 408 plántulas, mientras que por el cultivo y diferenciación de callos solamente 896 plántulas en un periodo de cinco meses. Posteriormente las plántulas fueron climatizadas durante dos meses en invernadero y transferidas a campo y observó que las plantas obtenidas eran normales y más vigorosas que la planta madre. Concluyó que la propagación por cultivo de ápices fue la mejor técnica de propagación para la obtención de caña-semilla, y la multiplicación por cultivo de callos y regeneración de plántulas es un método viable para la propagación y liberación de nuevas variedades prometedoras.

Méndez (1994) realizó un estudio sobre micropropagación de caña de azúcar a partir de yemas y ápices de la variedad comercial Mex 55-32 en cuatro medios de cultivo modificados basados en las sales del medio MS. Aisló los explantes y los cultivó en el medio nutritivo, incubándose a 25-27 °C, con una humedad relativa de 55 %, e iluminación con fotoperíodo de 16 horas/día a 1000 lux de intensidad. Encontró que hubo mejor respuesta de los ápices y el número de plantas obtenidas con el medio cuya formulación fue MS + 0.01 ANA + 0.01 BAP + 0.05 BIOTINA (mg L⁻¹). Sin embargo, estas plantas fueron de difícil enraizamiento. Las plantas obtenidas con el medio que contenía MS + 0.01 ANA + 0.05 BAP (mg L⁻¹) + 10 % de agua de coco (v/v) fueron más vigorosas, de color verde intenso y enraizaron aceptablemente.

Jiménez *et al.* (1995) realizó un estudio sobre la micropropagación de caña de azúcar a partir de ápices meristemáticos mediante la inducción de brotes axilares en un medio basado en las sales del medio MS. Usó medios sólidos para el establecimiento de los ápices y los tres primeros subcultivos de multiplicación, para el resto del proceso de propagación y enraizamiento utilizó medios líquidos. La regeneración de los ápices y la multiplicación de los brotes la obtuvo con la adición de 6-BAP y observó un aumento en el coeficiente de multiplicación a medida que se fueron haciendo los subcultivos *in vitro* obteniendo así coeficientes de multiplicación superiores de seis a los trece genotipos propagados. Concluyeron que las plantas obtenidas tuvieron un rendimiento agrícola significativamente superior a la semilla tradicional con un incremento del 14 y 50 % en las vitroplantas. El efecto del cultivo *in vitro* se manifestó aún después de dos multiplicaciones clonales en el campo.

El crecimiento de las plantas está en función del aire, luz, temperatura, agua, nutrimentos y la planta depende del suelo o sustrato para obtener estos últimos.

Al hacer referencia a la nutrición de la planta se considera la interrelación que se da entre el cultivo y los nutrimentos, es decir, manejar las cantidades en función de la demanda y el papel que desempeña cada uno de ellos en el crecimiento y desarrollo del cultivo.

2.5. La nutrición de las plantas

De los factores que influyen sobre el crecimiento y producción de plantas cultivadas, la nutrición vegetal, es sin lugar a dudas, uno de los que pueden ser más determinantes. Esta disciplina se ocupa de estudiar los procesos involucrados en la absorción y asimilación de nutrimentos por las plantas superiores, así como de los factores que los afectan y su relación con la producción y calidad de las cosechas. La nutrición vegetal, ha de dar respuesta a una serie de interrogantes que frecuentemente se plantean en relación a los requerimientos nutrimentales de las distintas especies de interés agrícola.

2.5.1. Elementos esenciales

Los elementos esenciales son aquellos que tienen una función conocida dentro del metabolismo de la planta; en ausencia de éstos se presentan síntomas visuales de deficiencia, que pueden ser corregidos cuando son abastecidos en cantidades que requieren las plantas. Son clasificados en macronutrientes y micronutrientes, de acuerdo a la cantidad que son requeridos por la planta: los macronutrientes son requeridos en cantidades mayores que los micronutrientes. Los macronutrientes y la forma iónica en que son absorbidos por la planta son: nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^-), fósforo (H_2PO_4^-), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) y azufre (SO_4^{2-}). Los micronutrientes y las formas iónicas en que éstos son preferentemente absorbidos por las plantas son: hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}), cobre (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), boro (H_3BO_3), cloro (Cl^-), níquel (Ni^{2+}) y molibdeno (MoO_4^-) (Alcántar y Trejo-Téllez, 2007). Carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) también son elementos esenciales para la planta. No obstante, no son incluidos en la clasificación antes mostrada por ser obtenidos de la atmósfera o del agua en el caso específico del H y del O.

2.5.2. Principales funciones de los nutrientes en plantas

Las exigencias nutrimentales varían entre especies, entre variedades o cultivares, e incluso entre estados fenológicos y parte de la planta. A continuación se detallan las funciones de los nutrientes en el metabolismo vegetal.

2.5.2.1. Nitrógeno

El nitrógeno es el elemento requerido en mayor cantidad por las especies vegetales. Tiene funciones estructurales en proteínas y ácidos nucleicos. Está también presente en coenzimas, amidas, ureidos y en la clorofila entre otros. Este nutriente participa también en procesos esenciales dentro del metabolismo vegetal como son la absorción iónica, fotosíntesis, respiración, multiplicación y diferenciación celular (Alcántar y Trejo-Téllez, 2007).

2.5.2.2. Fósforo

El fósforo (P) forma parte de fosfolípidos, que son derivados del ácido fosfoglicérico y sus principales representantes, lecitina y cefalinas, se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Estos compuestos participan activamente en la formación de las membranas, tanto a nivel de mitocondrias y cloroplastos. Forma parte también de AMP, NAD y NADP. Fotosíntesis, glucólisis, ciclo de Krebs, β -oxidación, oxidación directa de glucosa y descomposición de los carbohidratos, son procesos que involucran reacciones de fosforilación. El P participa también en la división celular y en la transferencia de las características hereditarias por los cromosomas como constituyentes del ADN y del ARN.

2.5.2.3. Potasio

El potasio (K^+) es un catión absorbido en mayor cantidad por las plantas y las gramíneas son acumuladoras de este nutrimento. Una parte considerable del K total en la planta se presenta como ión libre a nivel de vacuola y citoplasma, el cual genera una presión osmótica, lo que propicia que el agua de los vasos del xilema, debido al gradiente osmótico, penetre en la célula y origine así el turgor en ella, siendo ésta una de las principales funciones del K^+ en la planta. Además, el K^+ se acumula en la superficie de los cloroplastos y durante el proceso de fotosíntesis penetra en ellas, constituyendo un factor indispensable en este proceso (Pier y Berkowitz, 1987). Tanto la fosforilación fotosintética como la oxidativa (en respiración) requieren de K para realizarse (Wu *et al.*, 1991; Kilmer *et al.*, 1968; Epstein, 1992).

2.5.2.4. Calcio

El calcio (Ca^{2+}) es acumulado en vacuolas o en la pared celular formando pectatos de calcio, los cuales proporcionan estabilidad a ésta. En general las necesidades de Ca^{2+} son bajas y en la célula vegetal éste se distribuye de la siguiente manera: vacuola > pared celular > retículo endoplasmático > plasmalema > citoplasma (Marschner, 1995).

El ión Ca^{2+} tiende a formar compuestos quelatados. Elongación y multiplicación celular en los tejidos meristemáticos son procesos activados por el calcio. El calcio ejerce una acción favorable sobre crecimiento radical y es necesario en la germinación y para el crecimiento de los tubos polínicos (Marschner and Richter, 1973). En contraste con el K^+ , el Ca^{2+} , desempeña sobre todo funciones estructurales, lo cual es importante durante la reproducción celular (Hewitt, 1983). Además este nutrimento es activador de enzimas como la calmodulina, cuya función es vital en la biología de las plantas (Van der Luit *et al.*, 1999).

2.5.2.5. Magnesio

En general el magnesio (Mg^{2+}) participa en la regulación del pH celular y del balance anión-cation y es elemento constitutivo de la clorofila y de los ribosomas. (Walker and Weinstein, 1991; Cammarano *et al.*, 1972). El Mg es un cofactor de acercamiento de todas las enzimas que actúan sobre sustratos fosforilados (cinasas), favoreciendo el acoplamiento de tipo quelatante (enlaces coordinativos) entre la estructura pirofosfatada y la enzima o bien el sustrato y es por tanto de gran importancia en el metabolismo energético (fotosíntesis, glucólisis, ciclo de Krebs). Con frecuencia el Mg^{2+} puede ser sustituido por el Mn^{2+} , aunque la eficiencia de este último sobre las fosfoquinasas (enzimas que transfieren grupos fosfato con elevado intercambio de energía) y sobre las fosfotransferasas (enzimas que transfieren grupos fosfato con bajo intercambio de energía) no es tan grande como la del Mg^{2+} (Hewitt, 1983). Muchas enzimas requieren o son activadas por el Mg^{2+} , pero una reacción clave en donde participa es la regulación de la RuBP carboxilasa en el estroma del cloroplasto. La actividad de esta enzima es altamente dependiente del Mg y del pH (Pierce, 1986).

2.5.2.6. Hierro

El hierro (Fe) es absorbido por la planta como Fe^{3+} o Fe^{2+} , siendo la forma preferente ésta última; también puede ser absorbido como quelato; ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y flavinas han sido identificadas como moléculas transportadoras

de este nutrimento (Moog and Brüggemann, 1994). El Fe se presenta en numerosos grupos prostéticos; los citocromos, las citocromo oxidasa, la peroxidasa y la catalasa, son algunos ejemplos de proteínas que lo contienen. El Fe es cofactor en más de 130 enzimas que catalizan reacciones bioquímicas únicas e interviene en procesos como la fotosíntesis, respiración, reducción de nitratos y sulfatos (Imsande, 1998). Más del 60 % del Fe en la planta se localiza en el follaje formando parte o unido a proteínas y como proteína de almacenamiento (fitoferritina) para evitar toxicidad (Miller *et al.*, 1984).

2.5.2.7. Cobre

El cobre (Cu) es absorbido por las plantas en cantidades muy pequeñas. Es un elemento metálico que, como el hierro, forma complejos muy estables y fácilmente acepta y transfiere electrones. El Cu en la célula se encuentra principalmente en forma divalente, ya que como ión monovalente es muy inestable. La principal función del Cu en los vegetales es asociado con enzimas de la clase oxidoreductasas. En la oxidación terminal de la célula vegetal enzimas con Cu^{2+} (metaloproteínas) son las que reaccionan directamente con el oxígeno molecular (Marschner, 1995). En los cloroplastos se encuentra cerca del 70 % del Cu total. A diferencia de otros cationes, la mayor parte del Cu (más de 90 %) se encuentra en las células en forma de complejos, por lo que la concentración del Cu^{2+} libre generalmente es muy baja (Graham, 1979). La plastocianina es un componente central de la cadena transportadora de electrones del fotosistema I y unido a ella se encuentra más del 50 % del Cu total que se localiza en los cloroplastos (Sandmann and Börger, 1983). Las superóxido dismutasas (SOD) se encuentran presentes en todos los organismos aeróbicos y tienen un papel esencial en la desintoxicación por radicales superóxido. Las SOD son metaloproteínas que siempre se asocian con uno o varios de los metales: Cu, Mn, Zn y Fe. La citocromo oxidasa, enzima terminal de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, contiene dos átomos de Cu y dos de Fe en la porción hemo (Ayala and Sandmann, 1988).

2.5.2.8. Zinc

El zinc (Zn) es absorbido en cantidades muy pequeñas por las plantas, y favorece la unión y alineamiento sustrato-enzima. En los complejos Zn-enzimas el nutriente tiene dos funciones: catalítica y estructural. Algunos ejemplos de estas Zn-enzimas son la anhidrasa carbónica y la carboxipeptidasas. La alcohol deshidrogenada contiene dos átomos de Zn por molécula (Coleman, 1992). Algunas superóxido dismutasas (SOD) contienen también Zn. En plantas, numerosas enzimas como deshidrogenasas, aldolasas, isomerasas y fosfotransferasas no contienen al Zn^{2+} en su molécula, pero son activadas por éste. El Zn^{2+} es indispensable también en la síntesis de proteínas, debido a su función como componente estructural de los ribosomas y su participación en la estabilidad de éstos. En el metabolismo de carbohidratos hay varias enzimas que requieren de forma indispensable al Zn (Marschner, 2002). Un abastecimiento adecuado de Zn favorece la síntesis de triptofano y dado que éste considerado como un compuesto precursor del ácido indolacético (AIA), podría adjudicarse al Zn también una influencia en la formación de auxinas. Los bajos niveles de AIA en plantas deficientes en Zn podrían ser resultado de una inhibición de su síntesis o de un aumento en su degradación (Puzina, 2004).

2.5.2.9. Manganeso

El manganeso se puede presentar en las plantas en diversos estados de oxidación, pero la forma predominante es como Mn^{2+} . De forma semejante al magnesio, también el manganeso es capaz de activar numerosas enzimas. El mecanismo de acción de ambos es similar en las reacciones de fosforilación, ya que establecen un puente entre el pirofosfato y el sustrato o con la enzima. El manganeso tiene una función muy importante en los procesos redox. A pesar de que numerosas enzimas (alrededor de 35) son activadas por el Mn^{2+} , hasta ahora solamente se han reportado dos enzimas que lo tienen como constituyente, la manganeso proteína del fotosistema II (PS II) y la superóxido dismutasa (Mn-SOD). Muchas de las enzimas activadas por el manganeso catalizan reacciones de oxidación-reducción, descarboxilación y rompimientos

hidrolíticos. El manganeso tiene un papel central en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y en las reacciones de descarboxilación oxidativas o no oxidativas (Burnell, 1988; Ness and Woolhouse, 1980; Nable *et al.*, 1984).

2.5.2.10. Boro

Las necesidades de boro (B) varían considerablemente entre las especies. El B es absorbido por las plantas casi en su totalidad como H_3BO_3 o $B[OH]_3$ sin disociar a pH cercano a 7. El B es un elemento formativo de las estructuras vegetales, en cuya ausencia no transcurre normalmente la ordenación y diferenciación de las células y el desarrollo completo de varios tejidos (Lovatt, 1985). Posiblemente el transporte de carbohidratos es el proceso más afectado deficiencia de B (Lovatt and Dugger, 1984; Pilbeam y Kirkby, 1983). El B participa en el desarrollo celular, metabolismo del nitrógeno, la fecundación, la síntesis de pared celular, la absorción activa de sales, en el metabolismo hormonal, en el metabolismo de los lípidos, en el metabolismo del fósforo y en la fotosíntesis (Pilbeam and Kirkby, 1983). Aunque todas ellas son activadas por el B, pueden correlacionarse tanto con su función como elemento formativo, como con el buen transporte de azúcares. Goldbach (1997), describe varios efectos fisiológicos y morfológicos de la deficiencia de B en diferentes cultivos.

2.5.2.11. El sodio

Es pertinente mencionar en este apartado, que el sodio (Na) no es considerado un elemento esencial para las plantas superiores. No obstante, realiza funciones de gran importancia en el metabolismo de algunas especies agrupadas dentro del metabolismo C_4 como *Atriplex vesicaria*, *Amaranthus tricolor*, *Kochia childsii*, *Panicum miliaceum* y *Distichlis spicata* L. En el ciclo de Calvin en plantas C_4 , el CO_2 es concentrado en las células de la vaina para operar este mecanismo de concentración de CO_2 es requerido un flujo extensivo de metabolitos entre las células del mesófilo y las de la vaina; dicho flujo es dirigido por un gradiente de concentración de los metabolitos en el citosol. En plantas C_4 Na-deficientes se han reportado reducciones en las concentraciones de

fosfoenolpiruvato, oxaloacetato, malato, aspartato y 3-PGA, lo cual sugiere que la ausencia de este elemento es limitante en la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato (Alcántar y Trejo-Téllez, 2007).

2.5.3. Concentraciones críticas de macro y micronutrientes analizados.

Las plantas tienen un desarrollo y crecimiento adecuados, cuando son abastecidas con nutrientes esenciales en cantidades suficientes. Éstas varían entre especies y entre estados fenológicos como ya se mencionó anteriormente. En el cuadro 1 se presentan los intervalos de suficiencia nutricional en tejido vegetal para el cultivo de la caña de azúcar.

2.5.4 Relaciones entre niveles hormonales y nutrición en plantas

Desde hace varias décadas ha cobrado especial interés el estudio de las relaciones que guardan el nivel de fitohormonas con la concentración nutricional en tejido vegetal y el efecto de estas relaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Estudios pioneros fueron los realizados por Avery *et al.* (1937), quienes estudiaron las relaciones que guardan las deficiencias nutricionales con la concentración de hormonas en girasol y tabaco. Encontraron que las auxinas son escasamente detectadas en plantas sometidas a estrés por deficiencia de N, y que al suministrar N en forma de nitratos en la solución nutritiva, se incrementaba la concentración de auxinas en tejido vegetal, principalmente en hojas (Avery and Pottorf, 1945).

En presencia de succinato de sodio, la síntesis de auxinas y sustancias tipo giberelinas por la microflora en la rizosfera de plántula de pino (*Pinus silvestris* L) fue mayor que en la presencia de otras fuentes de carbono. Las cantidades más pequeñas de estas sustancias fueron encontradas en medios conteniendo piruvato de sodio. El mayor contenido de C (C:N = 60:1) no fue el óptimo para la síntesis de reguladores del

crecimiento. Los iones amonio inhibieron la producción de sustancias tipo giberelinas (Pokojska-Burdziej, 1981).

Jiang *et al.* (2001) estudiaron el efecto de la remoción del meristemo apical y la aplicación de ácido naftalenacético en la partición y el flujo de potasio en tabaco, encontrando que la aplicación de la fitohormona incrementó la asimilación del K^+ principalmente en tallos (64.5 % del K^+ total abastecido) y hojas (27 % del K^+ abastecido).

En plantas de papa crecidas en suelos deficientes de Zn y B, Puzina (2004) estudio el efecto de tratamientos con 3 mM Zn (como sulfato de zinc) y 8 mM B (como ácido bórico) en el contenido y relación de fitormonas en hojas y tubérculos maduros. El tratamiento con Zn tornó el balance hormonal a un incremento sustancial del contenido de citocininas y de la relación citocininas/ABA, así como un decremento en la relación AIA/citocininas. El tratamiento con B provocó un incremento en el contenido de AIA y en la relación AIA/citocinina. El tratamiento con Zn evitó la dominancia apical e incrementó el peso de tubérculos.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se observan diversas respuestas en el desarrollo de raíces en condiciones de deficiencia de P, incluyendo la inhibición del crecimiento primario de raíz e incremento en la formación de raíces laterales y en la elongación de pelos radicales. López Bucio *et al.* (2005) realizaron análisis genéticos y moleculares con diversos mutantes *lpr* (low phosphate-resistant root) que exhiben formación reducida de raíces laterales en condiciones de deficiencia de P y que son alelos del gen *BIG*, cuya proteína es requerida para el transporte normal de auxinas en *Arabidopsis*. La aplicación exógena de auxinas recuperó la formación normal de raíces laterales en los mutantes *lpr* cuando el medio contenía 1 mM o 1 μ M P. Cuando las plantas tipo silvestre fueron tratadas con brefeldina A, un metabolito de origen fúngico que bloquea el transporte de auxinas, las alteraciones en el desarrollo de raíces fueron semejantes a las observadas en los mutantes crecidas tanto en 1 mM como en 1 mM P, lo que sugiere que *BIG* participa en la activación de transportadores de auxinas en los

tejidos vasculares. En conclusión, el transporte de auxinas y la función de BIG afectan significativamente la elongación de los pelos radicales en Arabidopsis. Los mecanismos que activan las alteraciones de la arquitectura del sistema radical en respuesta a deficiencia de P parecen depender del transporte de auxinas y de BIG.

Sakakibara *et al.* (2006) reportan que el nitrógeno inorgánico funciona como una señal que regula la expresión de genes relacionados con la modulación del metabolismo y desarrollo. Para integrar las señales de nitrógeno, las plantas utilizan múltiples rutas de señalización. Una de esas rutas depende del nitrato, mientras que otra usa citocininas como mensajero. Las señales específicas del nitrato pueden regular el metabolismo del N y del C, y la biosíntesis de citocininas. Las señales mediadas por citocininas están relacionadas con el control del desarrollo, síntesis de proteínas y absorción de macronutrientos.

Estudios integrales del efecto de la variación de las relaciones hormonales en el estado nutrimental y el crecimiento en plantas no se han llevado a cabo, por lo que en esta investigación se analizó la influencia de diferentes niveles de auxinas y citocininas en el contenido de macronutrientos y micronutrientos en plantas de caña de azúcar cultivadas *in vitro* y su impacto en el crecimiento vegetal.

3. PLANTEAMIENTO Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La caña semilla disponible de cultivares importantes a veces es escasa debido a que se incorporan al cultivo comercial, como ocurre con los importantes cultivares promisorios por su rendimiento cultural, maduración y adaptación a cosecha mecánica.

El cultivo *in vitro*, representa un método de valor práctico para la obtención de plantas como una posibilidad de propagación asexual en forma acelerada y con un excelente estado sanitario, siendo además una herramienta muy útil para el mejorador.

En la actualidad existen numerosos medios de cultivo utilizados para la micropropagación de caña de azúcar, los cuales se basan principalmente en las sales de Murashige y Skoog (MS).

El efecto de las relaciones hormonales sobre el crecimiento y desarrollo de explantes de caña de azúcar ha sido ampliamente estudiado y actualmente existen protocolos bien establecidos para la propagación de esta especie. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se ha analizado de manera integral el efecto de las relaciones hormonales en el estado nutrimental de la planta y cómo esto afecta el crecimiento de explantes. Por estas razones en la presente investigación se ha planteado el estudio del efecto de distintas relaciones del 1,3 Acido indol acético (AIA) y de la Kinetina (KIN) sobre el crecimiento y estatus nutrimental de plantas en caña de azúcar micropropagadas.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del ácido indol acético (AIA) y de la kinetina (KIN) en indicadores de crecimiento y estatus nutrimental en vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del AIA en indicadores de crecimiento y estatus nutrimental en plantas cultivadas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).
2. Evaluar el efecto de la KIN en indicadores de crecimiento y estatus nutrimental en plantas cultivadas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).
3. Evaluar el efecto de la interacción de las hormonas AIA y KIN en indicadores de crecimiento y estatus nutrimental en plantas cultivadas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

4.3. Hipótesis

1. Los diferentes niveles de la hormona AIA afectaran de manera distinta las variables de crecimiento y de contenidos nutrimentales en tejido vegetal en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) propagadas *in vitro*.
2. Los diferentes niveles de la hormona KIN afectaran de manera distinta las variables de crecimiento y de contenidos nutrimentales en tejido vegetal en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) propagadas *in vitro*.
3. La interacción entre los diferentes niveles de AIA y KIN afectarán de manera distinta las variables de crecimiento y de contenidos nutrimentales en tejido vegetal en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) propagadas *in vitro*.

5. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, ubicado en el Km. 348 Carretera Federal Córdoba-Veracruz.

5. 1 Material biológico

Se utilizaron vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) de la variedad ITV 92-1424 proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba.

5. 2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962) con sus sales al 100 % (Cuadro 2) suplementado con sacarosa (azúcar comercial) al 2 % (p/v), adicionado con myo inositol 100 mg L⁻¹, tiamina 50 mg L⁻¹, piridoxina 100 mg L⁻¹, ácido nicotínico 50 mg L⁻¹, glicina 300 mg L⁻¹, biotina 100 mg L⁻¹, arginina 50 mg L⁻¹, ácido ascórbico 50 mg L⁻¹. El pH se ajustó con un potenciómetro (OAKTON) a 5.7 ± 0.1, como agente gelificante, se empleó phytigel en 2.15g L⁻¹. Se adicionaron 10 ml de medio de cultivo en frascos de 45 ml mismo que se esterilizó en autoclave vertical a 120°C durante 15 minutos.

5. 3. Condiciones ambientales *in vitro*

Los cultivos sembrados *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de incubación de ambiente controlado, con luz blanca fluorescente, cuya radiación fotosintética activa es de 50µM m⁻² s⁻¹, teniendo un fotoperiodo de 16/8 h y una temperatura promedio de 24°C ± 2. El material fue revisado sistemáticamente cada seis días para así evaluar nuestras variables de interés hasta su etapa final, seis semanas después de montado el experimento.

5. 4. Evaluación del efecto de la Kinetina (KIN) en interacción con el ácido 1,3-ácido indol acético (AIA) en la inducción de brotes adventicios en caña de azúcar

Se disectaron ápices de 3 mm de longitud a partir de plántulas *in vitro* de 6 semanas de edad, los cuales se sembraron en medio MS en condiciones asépticas, (Cuadro 2) variando los niveles del ácido indolacético (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg L⁻¹) y kinetina (0, 0.5, 1, 1.5 y 2mg L⁻¹), dando un total de 25 tratamientos (Cuadro 3) con 5 repeticiones. Se sembró un explante por frasco de 45 mL conteniendo 10 mL de medio. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones descritas en el inciso 5.3.

Cuadro 2. Relación de tratamientos para evaluar el efecto de la relación uxina/citocinina en el cultivo *in vitro* de caña de azúcar.

<i>Tratamiento</i>	<i>AIA</i> (mg L ⁻¹)	<i>KIN</i> (mg L ⁻¹)
1	0	0.0
2	0	0.5
3	0	1
4	0	1.5
5	0	2.0
6	0.5	0.0
7	0.5	0.5
8	0.5	1
9	0.5	1.5
10	0.5	2.0
11	1	0.0
12	1	0.5
13	1	1
14	1	1.5
15	1	2.0
16	1.5	0.0
17	1.5	0.5
18	1.5	1
19	1.5	1.5
20	1.5	2.0
21	2.0	0.0
22	2.0	0.5
23	2.0	1
24	2.0	1.5
25	2.0	2.0

5. 5. Variables a evaluar

Algunas de las variables a evaluar fueron con respecto al crecimiento y desarrollo vegetativo de la planta al igual que aspectos fenotípicos como; tamaño y número de brotes y tamaño y número de hojas.

5.5.1. Desarrollo

A las seis semanas se evaluaron: número de brotes, tamaño de brotes, número de hojas, tamaño de hojas, número de raíces y tamaño de raíces.

Dichas vitroplantas fueron lavadas perfectamente con la finalidad de remover por completo residuos de medio de cultivo que pudieran existir y alterar los análisis nutrimentales. Posteriormente las vitroplantas fueron puestas en bolsas de estraza y llevadas a una estufa de secado, a una temperatura de 70 °C por tiempo específico de 72 horas. Una vez concluido el tiempo se evaluó la variable, biomasa seca.

5.5.2. Contenido nutrimental

En el material vegetal se determinó la concentración de; P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Na bajo el siguiente procedimiento.

Pesado de la muestra. Cada una de las muestras fue pesada y posteriormente triturada con la ayuda de un mortero. Una vez triturada la muestra, fue pesada nuevamente y se tomó como variable biomasa medida en peso seco. Todas y cada una de las muestras fueron depositadas en tubos de ensaye (200 X 20 mm) para su digestión.

Predigestión. La digestión de la muestra se inició agregando con la ayuda de una bureta, 6 mL de mezcla digestora (HNO_3 y HClO_4 , 2:1 v/v) y dos perlas de cristal (para evitar que las muestras se adhirieran a los tubos de digestión) por tubo de ensaye con la muestra del material vegetal contenido. Tal muestra se dejó reposar por 24 horas dentro de una campana de extracción de gases.

Digestión. Concluidas 24 h del proceso de predigestión, las muestras se sometieron a digestión poniéndolas sobre una plancha a una temperatura desde 100 °C.

Una vez que la muestra ha alcanzado los 100 °C se observó la salida de vapores con tonalidad parda. La plancha se mantuvo por 20 minutos en la misma temperatura, posteriormente se aumentó la temperatura a 150 °C y se dejan las muestras entre 30 y 45 minutos. Al finalizar este tiempo la temperatura de la plancha se mantiene entre 200 y 240 °C. En esta fase las muestras permanecieron hasta que comenzaron a salir vapores claros y las muestras se tornan transparentes y de esta forma se da por terminado el proceso de digestión. Las muestras se dejaron enfriar y aparecen cristales de color blanco. Entonces, las muestras se calientan ligeramente con un poco de agua desionizada hasta que dichos cristales desaparecen. Las muestras se transfirieron y aforaron con agua desionizada en matraz aforado de 25 mL de capacidad. El matraz con la muestra contenida se agita un par de veces y finalmente la muestra es filtrada y depositada en frascos de 50 mL para realizar el análisis nutricional. En este extracto se determinó el contenido de; P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B, utilizando un equipo de espectrofotometría de gases de absorción atómica de plasma acoplado (ICP-AES Liberty II).

5. 6. Análisis estadístico

Para los datos de las variables de crecimiento se realizó un análisis usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (2000) y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Los datos de las variables nutricionales fueron analizados usando el paquete estadístico SAS (2000), para un experimento factorial 5^2 , utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las respuestas de las plantas de caña de azúcar a los tratamientos implementados se han agrupado en dos vertientes: aquellas relacionadas con el crecimiento vegetal y las relacionadas con la nutrición de las plantas micropropagadas.

6.1. Crecimiento vegetal

6.1.1 Efecto de la auxina AIA en el tamaño y número de brotes y hojas

En la presente investigación se encontró que los niveles de la auxina ácido indolacético (AIA) tienen efectos significativos en el número de brotes emitidos por vitroplantas de caña de azúcar (Cuadro 3). La media más alta ($p \leq 0.05$) se observó en los tratamientos que incluyen 0.5 mg L^{-1} AIA, la cual fue de 48.12 brotes emitidos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de brotes (NB) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.

AIA (mg L^{-1})	Número de Brotes (NB)	Desviación estándar
0.0	46.73	15.16
0.5	48.12	6.83
1.0	27.72	19.55
1.5	21.77	21.37
2.0	15.20	12.84

En seguida se ubicaron las medias de los tratamientos que no incluyeron la fitohormona AIA en el medio de cultivo. Fue clara la tendencia de que al aumentar los niveles de AIA por arriba de 0.5 mg L^{-1} , el número de brotes emitidos caía significativamente ($p \leq 0.05$). Lo que coincide con Pierik (1990) en donde observó que estas fitohormonas en cantidades mayores generalmente producen inhibición de brotes axilares y adventicios.

Para las variables Tamaño del brote (TB) y número de hojas (NH) no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) (Cuadro 4) al comparar las medias entre tratamientos.

Cuadro 4. Tamaño de brotes (TB), Número de hojas (NH) y Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.

AIA (mg L^{-1})	Tamaño de brotes (TB) cm	Número de Hojas (NH)	Tamaño de hojas (TH) cm
0.0	1.18	4.52	1.54
0.5	2.50	4.20	1.92
1.0	1.93	3.24	1.23
1.5	2.76	3.45	1.77
2.0	3.05	3.56	2.05

Para el caso de la variable tamaño de hoja (TH) existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) únicamente al comparar las medias de los tratamientos que incluyeron 2.0 mg L^{-1} AIA con los que incluían 1.0 mg L^{-1} AIA y viceversa (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de medias de la variable número de brotes (NB) en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas con diferentes niveles de la auxina AIA en el medio de cultivo.

AIA (mg L^{-1})	Diferencia entre medias	Simultáneo 95 % Límites de confianza	Significancia
2.0 – 1.0	00.81	00.01 1.61	*
1.0 – 2.0	-00.81	-1.61 -00.01	*

Las comparaciones importantes del nivel de 0.05 están indicadas por *.

Las auxinas promueven el crecimiento en tallos y coleóptilos. Este crecimiento se produce por un aumento en la extensibilidad de la pared celular, debido a que estas fitohormonas inducen el transporte de protones hacia la pared celular tanto por estimulación de H^+ -ATPasas existentes como por el incremento en la síntesis de estas proteínas. La capacidad de los protones para provocar la pérdida de pared celular está

mediada por expansinas, proteínas que rompen los puentes de hidrógeno entre polisacáridos de la pared. La elongación celular también está regulada por la captación de solutos y por la síntesis y depósito de polisacáridos y proteínas necesarios para mantener la capacidad de desgaste de la pared inducida por ácidos (Soberón *et al.*, 2007). Las auxinas también promueven la formación de raíces adventicias en hojas y tallos y la dominancia apical, y favorecen la floración e inducen la diferenciación vascular (Perrot-Rechenmann and Napier, 2005). La proteína ABA I es el receptor de auxinas, pues se une y fija estas fitohormonas en primer lugar en la cadena de transducción de señales celulares. Su sistema de transducción involucra AMPc y la cascada de MAP cinasa. La activación transcripcional de genes involucra la ubiquitinación de proteínas reguladoras de ADN (Soberón *et al.*, 2007). En esta investigación se demostró que hubo una influencia significativa del nivel de 0.5 mg L⁻¹ AIA en la emisión de brotes, aunque no afectó ni el tamaño de brotes como tampoco el tamaño y número de hojas de la misma manera que lo hizo con la primera variable.

6.1.2 Efecto de la citocinina KIN en el tamaño y número de brotes y hojas

Respecto al efecto de la citocinina kinetina, el número de brotes y hojas tendió a ser mayor en los tratamientos donde se incluyó KIN 0.5 mg L⁻¹, aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguna de las variables de crecimiento evaluadas en ninguno de los niveles estudiados de este segundo factor (KIN) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número de brotes (NB), Tamaño del brote (TB), Número de hojas (NH) y Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.

KIN (mg L ⁻¹)	Número de brotes (NB) cm	Tamaño del brote (TB) cm	Número de hojas	TH cm
0.0	32.73	2.03	3.13	1.36
0.5	37.12	2.72	4.32	1.91
1.0	32.59	2.34	3.77	1.64
1.5	30.96	2.53	3.84	1.80
2.0	26.32	2.47	3.84	1.78

Las citocininas son hormonas vegetales que derivan de adeninas sustituidas y que promueven la división celular en tejidos no meristemáticos. Son producidas en los órganos en crecimiento y en el meristemo de raíz. Como derivan de una purina, se unen a la cromatina del núcleo y estimulan la síntesis de ARN y enzimas y promueven el estado de transición de la fase G2 en la mitosis. Desde el punto de vista fisiológico las citocininas promueven la división celular y formación de órganos, el retardo de la senescencia (debido a su propiedad de generar alta división celular son fuente de nutrientes, por lo que realizan su efecto de retardo de la senescencia), el desarrollo de yemas laterales, la partenocarpia y la floración de plantas de días corto (Soberón *et al.*, 2007). En esta investigación sin embargo, no se observaron efectos significativos del factor KIN en ninguna de las variables evaluadas.

6.1.3 Efecto de la interacción de los factores AIA-KIN en el tamaño y número de brotes y hojas

El efecto de las interacciones de las hormonas AIA y KIN en las variables de crecimiento evaluadas (Cuadro 7) indica que la combinación que incrementa significativamente el número de brotes (NB) es 0.00 mg L⁻¹ AIA con 0.5 mg L⁻¹ KIN (57.2 brotes), seguida de la interacción 0.05 mg L⁻¹ AIA con 0.5 mg L⁻¹ KIN (53.2 brotes). Esto significa que a bajos niveles de ambas hormonas se obtiene el mayor número de brotes por unidad experimental. También se observa que al aumentar los niveles de ambas hormonas en el medio de cultivo, así también se incrementa el tamaño de los brotes (TB), a expensas del número de los mismos. En resumen, se puede observar que con niveles bajos de ambas hormonas o en ausencia de AIA se obtiene un mayor número de brotes, pero su tamaño es pequeño. Por el contrario, con los niveles más elevados de estas mismas hormonas, el tamaño de los brotes aumenta, pero se obtiene un menor número de ellos. Se observa que la mayor parte de estas interacciones presentan diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) para la variable NB.

Cuadro 7. Número y tamaño de brotes en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA y de la citocinina KIN en el medio de cultivo.

AIA	KIN	NB	Desviación estándar	TM cm	Desviación estándar
0	0	46.67	2.88	1.20	0.26
0	0.5	44.80	17.54	1.70	0.38
0	1	46.80	19.89	1.76	0.27
0	1.5	57.20	11.23	2.38	0.58
0	2	38.20	14.09	2.10	0.50
0.5	0	50.20	6.87	1.94	0.15
0.5	0.5	53.20	8.84	2.50	0.93
0.5	1	45.20	4.65	2.44	0.39
0.5	1.5	44.40	6.02	3.00	1.02
0.5	2	47.60	5.59	2.64	0.93
1	0	21.40	19.69	1.16	1.06
1	0.5	31.20	11.67	3.24	1.71
1	1	28.40	25.96	1.72	1.21
1	1.5	34.00	22.10	2.02	1.38
1	2	23.60	21.68	1.52	1.54
1.5	0	36.40	22.14	2.88	2.19
1.5	0.5	31.60	29.55	2.42	2.21
1.5	1	26.00	5.65	2.30	1.13
1.5	1.5	12.00	11.04	1.88	1.75
1.5	2	5.40	7.30	4.08	2.41
2	0	14.60	15.99	2.64	2.59
2	0.5	24.80	16.76	3.72	1.56
2	1	12.60	10.89	3.48	2.38
2	1.5	7.20	4.20	3.40	2.49
2	2	16.80	10.47	2.04	1.57

El análisis estadístico de los datos obtenidos para las variables tamaño del brote (TB), número de hojas (NH) y tamaño de la hoja (TH) no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$) (Cuadro 7 y 8).

Cuadro 8. Número y tamaño de hojas en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA y de la citocinina KIN en el medio de cultivo.

Nivel de AIA	Nivel de KIN	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
		Numero Hoja (NH)	Tamaño hoja (TH) cm		
0	0	4.00	0.00	0.66	0.11
0	0.5	5.00	0.70	1.44	0.36
0	1.5	5.00	0.70	2.18	0.64
0	2	4.40	0.54	1.80	0.44
0.5	0	3.80	0.83	1.48	0.23
0.5	0.5	4.40	0.54	2.02	0.71
0.5	1	4.80	0.44	2.08	0.35
0.5	1.5	4.00	0.70	2.12	0.82
0.5	2	4.00	0.00	1.90	0.67
1	0	2.40	2.19	0.80	0.77
1	0.5	5.00	1.22	2.20	1.19
1	1	3.00	2.12	1.04	0.72
1	1.5	3.40	1.94	1.20	0.74
1	2	2.40	2.19	0.94	0.90
1.5	0	3.00	1.73	1.80	1.25
1.5	0.5	2.80	2.58	1.44	1.32
1.5	1	4.00	1.41	0.90	0.28
1.5	1.5	2.80	2.68	1.36	1.28
1.5	2	5.00	3.39	2.86	1.65
2	0	2.80	2.58	1.78	1.70
2	0.5	4.40	0.89	2.60	0.87
2	1	3.20	1.92	2.30	1.46
2	1.5	4.00	2.91	2.18	1.78
2	2	3.40	1.94	1.40	1.03

Como factor independiente, la fitohormona AIA tiene un mayor efecto en la emisión de brotes en vitroplantas de caña de azúcar cuando se adiciona en el medio de cultivo a dosis bajas (0.5 mg L⁻¹ AIA). Así también, que la kinetina no afecta significativamente las variables de crecimiento en caña de azúcar. Sin embargo, cuando se analiza el efecto de la interacción de ambos factores, se observa que ambos factores

aumentan el número de brotes y de hojas cuando son administrados en bajas dosis en el medio de cultivo, y que a mayores dosis disminuye el número pero aumenta el tamaño de ambas variables. En un estudio sobre el efecto de reguladores de crecimiento y pretratamiento con frío en la androgénesis *in vitro* de *Solanum iopetalum* L, Pacheco-Sánchez *et al.* (2003) encontraron que las dosis medias y bajas de auxinas y citocininas en el medio de cultivo estimulan de una mejor manera la callogénesis en esta especie, lo cual coincide con los resultados reportados en la presente investigación en caña de azúcar.

Uno de los factores importantes para el desarrollo de los ápices cultivados *in vitro* fue la composición del medio de cultivo y el balance entre los reguladores de crecimiento. En esta investigación el balance entre auxinas y citocininas fue determinante en la obtención de plántulas de caña de azúcar (Figura 5).

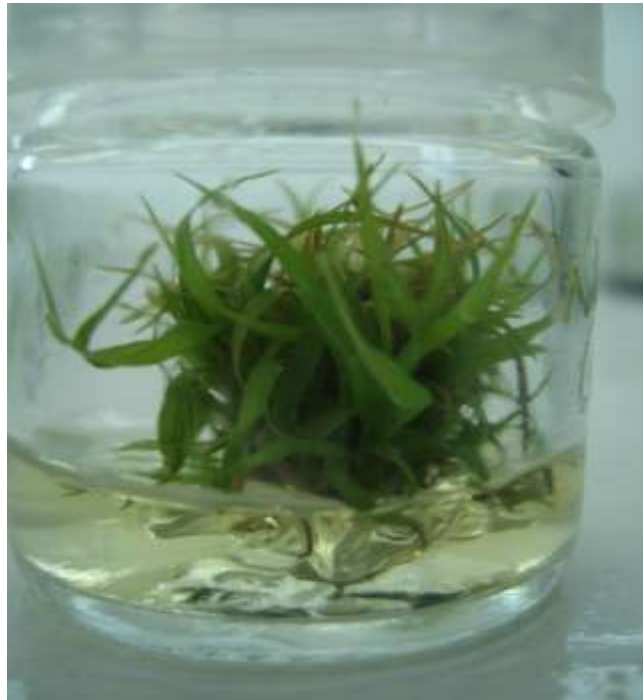


Figura 5. Vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 en un medio de cultivo MS adicionado con AIA 0.5 mgL^{-1} y KIN 0.5 mg L^{-1} .

6.2. Nutrición de las plantas

El análisis estadístico de las medias de los datos relacionados con la nutrición de las vitroplantas muestra que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). El factor ácido indolacético (AIA) afectó significativamente la acumulación de macro y micronutrientes en tejido vegetal (Cuadro 9). Para el caso de fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), y sodio (Na) los valores más altos se obtuvieron con 0.5 mg L⁻¹ AIA. Para estos mismos elementos, la ausencia de esta fitohormona (AIA) ocasionó valores que se ubicaron en el segundo lugar más alto después de los observados con 0.5 mg L⁻¹ AIA en el medio de cultivo. Los valores más bajos, por lo general se obtuvieron en plantas crecidas en medios de cultivo conteniendo 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹ AIA. A este respecto, se sabe que para caña de azúcar, concentraciones de 0.1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA, otra auxina) en el medio de cultivo, es suficiente para promover un sano crecimiento *in vitro* de esta especie (Franklin *et al.*, 2006). Por su parte, Gill *et al.* (2005) sostienen que 5 mg L⁻¹ de ANA mejoran la regeneración de vástagos en las variedades Co J 64, Co J 83 y Co J 86 de caña de azúcar y que en ausencia de auxinas no hay regeneración de tejidos en estas variedades. Sin embargo, ningún autor discute aspectos que relacionen los niveles hormonales en el medio de cultivo con la nutrición de la planta.

Cuadro 9. Concentraciones nutrimentales en tejido vegetal de plantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 propagadas en medios de cultivo conteniendo diferentes niveles de ácido indolacético.

AIA mg L ⁻¹	P g/kg	K g/kg	Ca g/kg	Mg g/kg	Na g/kg	Fe Mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Mn mg/kg	B mg/kg
0	3.0b	3.4b	3.1b	2.1b	1592.4b	172.1b	4.5b	117.2b	120.6b	164.1e
0.5	3.9a	3.9a	4.9a	3.2a	2156.9a	295.4^a	5.0a	181.9a	202.9a	238.8c
1.0	2.3e	2.2e	2.2c	1.6c	1424.5c	139.6e	1.3c	99.0c	90.1c	214.6d
1.5	2.5d	2.5d	2.0d	1.5d	1259.9d	144.8d	0.5d	89.4e	69.3d	258.1b
2.0	2.8c	2.8c	1.8e	1.5d	1070.3e	170.1c	0.5d	92.4d	69.3d	266.8a

Letras distintas en una misma columna (para un mismo nutriente) indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos. Los niveles de concentración más alto están marcados con negritas.

En el caso del boro se excluye la tendencia general observada en la mayoría de los nutrimentos analizados en este estudio, pues los valores más altos de este elemento se encontraron en plantas crecidas en medios con 2.0 mg L⁻¹ AIA. En uno de los experimentos pioneros para descifrar la importancia del boro en la fisiología de la planta, Dyar y Webb (1961) demostraron que este elemento es esencial en el metabolismo de auxinas. El boro es requerido para la elongación celular y la morfogénesis normal de embriones. La deficiencia de boro en presencia de ácido indolacético exógeno ocasiona ausencia de elongación celular. En presencia de ácido giberélico, la deficiencia de boro ocasiona ausencia completa del desarrollo celular. Cuando se adicionan tanto ácido indolacético como ácido giberélico, la ausencia de boro tiene menores efectos detrimentales en el desarrollo vegetativo (Birnbaum *et al.*, 1974). Puzina (2004) demostró que la aplicación de boro incrementa el contenido de ácido indolacético en plantas de papa, y postula que resultados similares se podrían esperar cuando los explantes *in vitro* reciben niveles crecientes de boro, lo cual puede ser observado en este estudio, pues el nivel más alto de AIA (2 mg L⁻¹) producen la concentración más elevada de este elemento en tejido vegetal.

Se puede concluir que para el factor auxina, un nivel de 0.5 mg L⁻¹ AIA en el medio de cultivo produce las concentraciones más altas de P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Zn y Mn. Los niveles más bajos de estos nutrimentos se obtienen en plantas crecidas en medios conteniendo 1 mg L⁻¹ AIA o concentraciones mayores.

En el caso de la kinetina el análisis estadístico de las medias de los datos relacionados con la nutrición de las vitroplantas muestra que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$) (Cuadro 10). La kinetina afectó significativamente en la acumulación de fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), sodio (Na) y boro (B) donde los valores más altos se obtuvieron con concentraciones de 1 a 1.5 mg L⁻¹ KIN.

Cuadro 10. Concentraciones nutrimentales en tejido vegetal de plantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 propagadas en medios de cultivo conteniendo diferentes niveles de kinetina.

KIN	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Zn	Mn	B
mg L ⁻¹	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	Mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
0	2.0e	2.0e	2.0e	1.4e	1101.4e	148.8e	1.1e	85.5e	81.0e	161.6c
0.5	2.4d	2.4d	2.8c	2.0c	1475.9d	197.2b	3.6a	96.7d	118.8b	153.8c
1.0	3.9a	3.9a	3.0b	2.2b	1731.5a	217.7a	2.9b	145.4a	115.0c	326.6a
1.5	3.1b	3.1c	3.6a	2.5a	1706.9b	184.7c	2.8c	133.6b	137.7a	250.2b
2.0	3.0c	3.4b	2.6d	1.9d	1488.1c	173.5d	1.7d	119.2c	99.7d	250.2b

Letras distintas en una misma columna (para un mismo nutrimento) indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos. Los niveles de concentración más alto están marcados con negritas

El caso del cobre (Cu) muestra una diferencia en la tendencia general observada en la mayoría de los nutrimentos analizados en este estudio, pues los valores más altos de este elemento se encontraron en plantas crecidas en medios con 0.5 mg L⁻¹ KIN. El Cu desempeña funciones catalíticas, siendo parte de varias enzimas importantes como la polifenol oxidasa y la ácido ascórbico oxidasa. Está presente en la plastocianina de los cloroplastos, un componente importante del sistema transportador de electrones de la fotosíntesis y puede estar involucrado en la reducción de nitritos (Bidwell, 1979).

Para el factor citocinina, se concluye que la fitohormona KIN produce las mayores concentraciones de P, K, Na, Fe, Zn y B a niveles de 1.0 mg L⁻¹, mientras que para Ca, Mg y Mn los valores más altos se observan a una concentración de KIN de 1.5 mg L⁻¹. En general, los valores más bajos de los nutrimentos encontrados en tejido vegetal se registraron en los tratamientos con menores niveles de KIN (0.0 y 0.5 mg L⁻¹ KIN).

Cuando se analizan las interacciones entre los factores AIA y KIN se puede observar que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos en todos los nutrimentos analizados.

Para el nutrimento P se encontraron 21 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T3 y T10, los cuales incluyen una combinación de 0 a 0.5 mg L⁻¹ de AIA y de 1 a 2 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T12 y T21, los cuales incluyen de 1.0 a 2.0 mg L⁻¹ AIA y 0.5 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 11. Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de P en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
A	4.957888	3	T3
A	4.925615	3	T10
B	4.431142	3	T23
C	4.308395	3	T4
D	4.253122	3	T7
E	4.089318	3	T8
F	3.911505	3	T9
G	3.699118	3	T18
H	3.285625	3	T24
I	3.189682	3	T25
J	2.873582	3	T11
K	2.661745	3	T15
L	2.516155	3	T19
M	2.437072	3	T13
N	2.356768	3	T2
N	2.347195	3	T20
N	2.342422	3	T6
O	2.256648	3	T17
P	2.021818	3	T5
Q	1.982022	3	T16
R	1.933912	3	T14
S	1.888572	3	T22
T	1.695558	3	T1
U	1.613465	3	T12
U	1.579908	3	T21

Para el nutrimento K se encontraron 25 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T1 y T2 los cuales incluyen una combinación de 0 mg L⁻¹ de AIA y de 0 a 0.5 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T12 y T21, los cuales incluyen 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ AIA y de 0 a 0.5 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 12. Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de K en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>					<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
			A		4.9537	3	T3
			A		4.9215	3	T10
	B		A		4.4270	3	T23
	B		A		4.2490	3	T7
	B		A	C	4.0852	3	T8
	B		A	C	4.0802	3	T4
	B		A	C	4.0771	3	T5
	B	D	A	C	3.9074	3	T9
E	B	D	A	C	3.6950	3	T18
E	B	D	F	C	3.2815	3	T24
E	B	D	F	C	3.1855	3	T25
E	H	D	F	C	2.8694	3	T11
E	H	D	F		2.6576	3	T15
E	H		F	G	2.5120	3	T19
E	H		F	G	2.4329	3	T13
E	H		F	G	2.3526	3	T2
	H		F	G	2.3430	3	T20
	H		F	G	2.3383	3	T6
	H		F	G	2.2525	3	T17
	H		F	G	1.9779	3	T16
	H			G	1.9298	3	T14
	H			G	1.8844	3	T22
	H				1.6914	3	T1
	H				1.6093	3	T12
	H				1.5758	3	T21

Para el nutrimento Ca se encontraron 22 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T4 y T7 los cuales incluyen una combinación de 0 a 0.5 mg L⁻¹ de AIA y de 0.5 a 1.5 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T12 y T22, los cuales incluyen 1.0y 2.0 mg L⁻¹ AIA y de 0.5 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 13. Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de Ca en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>		<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
	A	7.63664	3	T7
	B	6.33828	3	T4
	C	5.68359	3	T9
	D	4.73033	3	T10
	E	3.92966	3	T8
	F	3.56746	3	T13
	G	3.36114	3	T3
	H	2.77111	3	T23
	I	2.61880	3	T11
J	I	2.55004	3	T6
J	K	2.45177	3	T20
L	K	2.35639	3	T5
L		2.32514	3	T19
	M	2.10265	3	T17
N	M	1.99191	3	T24
N		1.98357	3	T15
N		1.97759	3	T1
N		1.94620	3	T2
	O	1.79249	3	T14
P	O	1.71327	3	T16
P	Q	1.64316	3	T18
P	Q	1.61955	3	T21
	Q	1.58146	3	T25
	R	1.45911	3	T22
	R	1.34968	3	T12

Para el nutrimento Mg se encontraron 24 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T7 y T9 los cuales incluyen una combinación de 0.5 mg L^{-1} de AIA y de 0.5 a 1.5 mg L^{-1} de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T12 y T21, los cuales incluyen de 1.0 a 2.0 mg L^{-1} AIA y 0.5 mg L^{-1} KIN, respectivamente.

Cuadro 14. Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de Mg en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
	A	4.55990	3 T7
	B	3.90444	3 T9
	C	3.47801	3 T4
	D	3.15787	3 T10
	E	2.70211	3 T3
	F	2.56297	3 T8
	G	2.18555	3 T13
H	G	2.15187	3 T24
H		2.12299	3 T23
	I	1.95000	3 T6
	J	1.78534	3 T18
K	J	1.73414	3 T20
K		1.69273	3 T11
K	L	1.68851	3 T15
K	L	1.68134	3 T2
M	L	1.63394	3 T19
M		1.61184	3 T5
	N	1.48475	3 T25
	N	1.43357	3 T17
	O	1.36110	3 T14
	P	1.24833	3 T1
Q	P	1.22274	3 T22
Q		1.17034	3 T16
	R	1.11036	3 T12
	S	0.99102	3 T21

Para el nutrimento Fe se encontraron 16 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T7 y T9 los cuales incluyen una combinación de 0.5 mg L⁻¹ de AIA y de 0.5 a 1.5 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T12 y T22, los cuales incluyen de 1.0 a 2.0 mg L⁻¹ AIA y 0.5 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 15. Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de Fe en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
	A	505.417	3 T7
	B	298.310	3 T9
	C	266.813	3 T3
	C	265.563	3 T10
	C	260.303	3 T8
	D	245.560	3 T23
	E	223.983	3 T11
	F	207.970	3 T18
	F	202.463	3 T25
	G	193.533	3 T4
	H	177.503	3 T24
	I	161.623	3 T15
J	I	153.477	3 T2
J		151.140	3 T19
J	K	147.707	3 T6
	K	142.023	3 T1
	L	133.370	3 T20
	M	123.667	3 T17
	M	122.507	3 T21
	N	108.277	3 T13
	N	107.923	3 T16
	N	104.737	3 T5
	N	103.247	3 T14
	N	102.720	3 T22
	N	101.043	3 T12

Para el nutrimento Cu se encontraron 14 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T3 y T7 los cuales incluyen una combinación de 0 a 0.5 mg L⁻¹ de AIA y de 0.5 a 1 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T18 y T24, los cuales incluyen de 1.5 a 2.0 mg L⁻¹ AIA 1.0 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 16. Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de Cu en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Medía</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
A	9.35233	3	T7
B	7.15200	3	T3
C	6.78300	3	T4
D	4.85833	3	T2
D	4.75633	3	T10
D	4.74767	3	T9
D	4.66633	3	T8
E	3.00933	3	T23
E	2.83500	3	T14
F	2.10367	3	T5
F	2.06433	3	T12
F	2.04900	3	T1
G	1.77467	3	T17
G	1.69600	3	T6
H	1.14567	3	T11
I	0.93400	3	T15
I	0.69600	3	T20
J	0.41667	3	T21
K	0.31400	3	T16
K	0.06733	3	T25
L	0.00000	3	T19
L	0.00000	3	T13
L	0.00000	3	T22
L	0.00000	3	T18
L	0.00000	3	T24

Para el nutrimento Zn se encontraron 19 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T4 y T7 los cuales incluyen una combinación de 0 a 0.5 mg L⁻¹ de AIA y de 0.5 a 1.5 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T21 y T22, los cuales incluyen 2.0 mg L⁻¹ AIA y 0.5 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 17. Efecto de las interacciones de AIA y KIN en la concentración nutrimental de Zn en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>	
A	241.070	3	T9	
B	216.080	3	T10	
C	178.820	3	T7	
C	178.617	3	T8	
D	169.417	3	T3	
E	164.337	3	T4	
F	154.080	3	T23	
G	122.073	3	T11	
G	121.440	3	T15	
H	113.583	3	T18	
H	111.570	3	T13	
I	102.213	3	T25	
J	95.199	3	T6	
K	J	93.869	3	T24
K	J	91.590	3	T19
K	J	91.573	3	T17
K		90.547	3	T2
L		83.573	3	T5
M		78.505	3	T1
M		77.522	3	T14
M		77.482	3	T16
N		73.051	3	T20
O		62.524	3	T12
O		60.406	3	T22
P		51.900	3	T21

Para el nutrimento Mn se encontraron 17 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T4 y T7 los cuales incluyen una combinación de 0 a 0.5 mg L⁻¹ de AIA y de 0.5 a 1.5 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T12 y T18, los cuales incluyen de 1.0 a 1.5 mg L⁻¹ AIA y de 0.5 a 1.0 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 18. Efecto de las interacciones de AIA y Kin en la concentración nutrimental de Mn en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
A	335.8333	3	T7
B	239.8100	3	T4
C	223.4700	3	T9
D	193.6767	3	T10
E	154.9433	3	T8
F	148.0767	3	T13
G	113.9067	3	T23
G	111.2433	3	T3
H	106.8333	3	T6
H	103.4400	3	T5
I	98.3893	3	T11
J	88.6010	3	T19
K	78.9267	3	T1
K	76.8103	3	T17
L	76.0667	3	T15
L	72.9937	3	T14
M	70.1200	3	T20
M	70.0570	3	T2
N	64.0647	3	T16
N	63.9540	3	T24
O	56.9073	3	T21
O	56.5207	3	T22
O	55.6387	3	T25
O	55.1040	3	T12
P	47.0460	3	T18

Para el nutrimento B se encontraron 15 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T18 y T24 los cuales incluyen una combinación de 1.2 a 2 mg L⁻¹ de AIA y de 1 a 1.5 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T12 y T22, los cuales incluyen de 1.0 a 2.0 mg L⁻¹ AIA y 0.5 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 19. Efecto de las interacciones de AIA y Kin en la concentración nutrimental de B en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey</i>	<i>Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>	
	A	462.813	3	T24	
	A	437.963	3	T18	
	B	368.327	3	T23	
	C	311.417	3	T20	
D	C	301.003	3	T15	
D	C	E	293.673	3	T8
D	F	E	269.060	3	T13
D	F	E	264.997	3	T19
	F	E	264.347	3	T3
	F	E	260.287	3	T7
	F		253.833	3	T11
	F		248.540	3	T10
	F		243.910	3	T9
	F		239.763	3	T25
	G		155.030	3	T2
	G		154.800	3	T14
	G		150.437	3	T5
	G		147.967	3	T6
	G		141.743	3	T16
	G		138.767	3	T21
	G		134.683	3	T17
H	G		125.993	3	T1
H	G		124.973	3	T4
H	G		124.817	3	T22
H			94.508	3	T12

Para el nutrimento Na se encontraron 21 grupos de respuesta estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El valor más alto se encontró en los tratamientos T4 y T7 los cuales incluyen una combinación de 0 a 0.5 mg L⁻¹ de AIA y de 0.5 a 1.5 mg L⁻¹ de KIN en el medio de cultivo, respectivamente. Por su parte, el valor más bajo se obtuvo en los tratamientos T21 y T22, los cuales incluyen 2.0 mg L⁻¹ AIA y 0.5 mg L⁻¹ KIN, respectivamente.

Cuadro 20. Efecto de las interacciones de AIA y Kin en la concentración nutrimental de Na en tejido vegetal de vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424.

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>observaciones</i>	<i>TRAT</i>
	A	3191.57	3 T7
	B	2661.53	3 T4
	C	2287.50	3 T13
	C	2272.57	3 T10
	D	2090.73	3 T9
	E	1930.27	3 T8
	F	1634.13	3 T3
G	F	1612.63	3 T15
G	F	1602.60	3 T23
G		1583.33	3 T19
	H	1343.67	3 T2
	I	1299.50	3 T6
	I	1297.00	3 T5
	J	1251.93	3 T20
	K	1203.47	3 T18
	K	1186.40	3 T16
	L	1144.90	3 T14
	L	1122.03	3 T11
	M	1074.37	3 T17
N	M	1054.10	3 T24
N	O	1025.80	3 T1
	O	1006.73	3 T25
	P	955.80	3 T12
	Q	873.65	3 T21
	R	814.43	3 T22

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

Teniendo como base los resultados obtenidos en los tratamientos establecidos en los experimentos del presente trabajo de investigación, se concluye que:

1. El AIA tiene un mayor efecto en la emisión de brotes en vitroplantas de caña de azúcar cuando se adiciona en el medio de cultivo a dosis bajas (0.5 mg L^{-1} AIA).
2. La KIN no afecta significativamente las variables de crecimiento en caña de azúcar.
3. La interacción de ambos factores aumentan el número de brotes y de hojas cuando son administrados en bajas dosis en el medio de cultivo, y a mayores dosis disminuye el número pero, aumenta el tamaño de ambas variables. Niveles bajos de ambas fitohormonas o en ausencia de AIA se obtiene un mayor número de brotes, pero su tamaño es pequeño. Por el contrario, con los niveles más elevados de estas mismas hormonas, el tamaño de los brotes aumenta, pero se obtiene un menor número de ellos.
4. Para el factor AIA, un nivel de 0.5 mg L^{-1} en el medio de cultivo produce las concentraciones más altas de P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Zn y Mn. Para estos mismos elementos, la ausencia de esta fitohormona (0 mg L^{-1} AIA) ocasionó valores que se ubicaron en el segundo lugar más alto después de los observados.
5. La KIN afectó significativamente en la acumulación de P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Na y B donde los valores más altos se obtuvieron con concentraciones de 1 y 1.5 mg L^{-1} KIN.
6. En las interacciones entre los factores AIA y KIN en concentraciones de 0.5 mg L^{-1} y 1.5 mg L^{-1} respectivamente se observó que existieron diferencias significativas entre tratamientos en los nutrimentos P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y Na.

7.2. Recomendaciones

1. Se recomienda utilizar dosis bajas de AIA (0.5 mg L^{-1}) dado que promueve un mayor número de brotes y un estado nutrimental mejor en plantas micropropagadas.
2. Para promover mayor número de brotes no se recomienda la aplicación de KIN.
3. La combinación de ambas hormonas es cuando ambas se aplican a bajas dosis, dado que promueven mayor número de brotes y mejor estado nutrimento.

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aceves Rubio J. L. y Hernández Hernández J. 1997. Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. Ciencia Administrativa. Vol. 1. Nueva época. 1997. Número uno. 213 p.
- Alcántar y Trejo Téllez 8"007)
- Amaya A., Cock J., Hernández P. e Irvine J. 1995. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA. Cali, Colombia. 117 p.
- Avery G. S. J. and Pottorf L. 1945. Auxin and nitrogen relationships in green plants. Amer. J. Bot.. 32: 666-669.
- Avery G. S. J., Burkholder P. R. and Creighton H. B. 1937. Nutrient deficiencies and growth hormones concentrations in *Helianthus* and *Nicotiana*. Amer. J. Bot. 26: 553-557.
- Ayala M. B. and Sandmann G. 1998. The role of copper in respiration of pea plants and heterotrophically growing *Scenedesmus* cell. Z. Naturforsch. 43c. 438-442.
- Barba R. and Nickell L. G. 1969. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugar cane, a monocotyledon. Planta J. 89:299-302.
- Bellone C. S., Carrizo de Bellone y Pedraza R. 1995. Colonization of sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus* and vesiculo arbuscular for the tropics. The role of biological nitrogen fixation. Angra dos Reis. Brasil. 206-207. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2005, 22:22-32 31.
- Bennett W. F. 1994. Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants. The American Phytopathological Society. St. Paulo.
- Bidwell R. G. S. 1979. Fisiología vegetal. A.G.T. Editor.
- Birnbaum E. H., Beasley C. A. and Dugger W. M. 1974. Boron deficiency in unfertilized cotton (*Gossypium hirsutum*) ovules grown *in vitro*. Plant Physiol. 54(6): 931-935.
- Burnell J. N. 1988. The Biochemistry of manganese in plants. Pp. 125-137. In. R. D. Graham, R. J. Hannah and N. C. Uren (eds.). Manganese in Soils and Plants. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Cakmak I., Marschner H. and Bangerth F. 1989. Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indol 3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). 117 p.

- Cammarano P., Felsani A., Gentile. M., Gualezi C., Romeo C. and Wolf G. 1972. Formation of active hybrid 80-S particles from subunits of pea seedlings and mammalian liver ribosome. *Biochem. Biophys. Acta.* 281:625-642.
- Carrillo Castañeda G., Vargas M. y Vargas-Villanueva M. 1986. Cultivo *in vitro* de *Saccharum officinarum* L. Efecto de la especialización sobre la rediferenciación. Centro de Genética. C. P. Chapingo, México. Turrialba. Vol. 36. Pg. 533-540.
- Celis A. H. G. 1978. Tesis de ingeniero agrónomo. Problemas especiales de experimentación cañera. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 22:84-90.
- Chee R. and Pool R. M. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of vitis cultured *in vitro*. *Sci. Hort.* 16:17-27.
- Coleman J. E. 1992. Zinc proteins: Enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 897-946.
- Constantopoulos G. 1970. Lipid metabolism of manganese-deficient algae. Effect of manganese deficiency on the greening and the lipid composition of *Euglena gracilis* Z. *Plant Physiol.* 45: 76-80.
- Debergh P. C. and Maene L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.* 14:335-345.
- Evans H. J. and Sorger G. J. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17: 47-46.
- Fitch M. M. and Moore H. P. 1991. Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. *Plant cell, tissue and organ culture.* 76 p.
- Goldbach H. E. 1997. A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: suggestions for further research and methodological requirements. *J. Trace and Microprobe Techniques* 15: 51-91.
- González-Arno M. T., Donest N. V., Popov A. S. and Butenko R.G. 1990 Patente: Método para el cultivo de meristemos apicales de caña de azúcar. Certificado No. 1601118. Certificado No 22193. Cuba.
- Graham R. D. 1979. Transport of koper and magnese to the xylem exudates. *J Plant Nutr* 3: 643-654.
- Hackett W. P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plant. *Hort. Rev.* 7: 109-155.
- Havlin L. J., Beaton D. J., Tisdale S. L. and Nelson W. L. Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management. Prentice Hall. New Jersey, USA. 1999. 6th ed. 499 p.

- Hanson J. B. 1984. The function of calcium in plant nutrition. Pp. 149-208. *In*; P. B. Tinker and A. Läuchli (eds.). *Advances in Plant Nutrition*. Praeger special Studies, Praeger Scientific, New York. 308 p.
- Hartmann H. T. and Kester D. E. 1998. *Propagación de plantas*. Compañía editorial Continental, S. A. de C. V. México, D. F. 196 p.
- Heinz D. J. and Mee G. W. P. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* sp. 149-164. 173 p.
- Hewitt E. J. 1983. A perspective of mineral nutrition: essential and functional metals in plants. Pp. 227-323. *In*: D. A. Robb and W. S. Pierpoint (eds.). *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants*. Academic Press, New York.
- Humbert R. P. 1974. *El cultivo de la caña de azúcar*. Edit. Continental. México, D. F. 719 p.
- IMPA. 1975. *Veinticinco Años de Investigación de Investigación Cañera en México*. Comisión Nacional de la Industria Azucarera. Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar. Serie Divulgación Técnica, Libro No 8. México, D. F.
- Imsande J. 1998. Iron, sulfur and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. *Physiol. Plant* 103: 139-144.
- James J., Dyar J. J. and Webb K. L. 1961. A relationship between boron and auxin in C14 translocation in bean plants. *Plant Physiol.* 36(5): 672–676.
- Jiang F., Lee C., Jeschke W. D. and Zhang F. 2001. Effect of top excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on partition and flow of potassium in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 52 (364): 2143-2150.
- Jiménez E., Pérez P. J., Gil V., Herrera I., García I. y Alfonso E. 1995. Sistema para la producción de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Congreso Habana. Avances en biotecnología moderna. Vol. 3 11.15.
- Kamara K. A. 2001. *Nutrición, Regulación del Crecimiento y Desarrollo Vegeta*. Coahuila, México. 126 p.
- King J. N., Mungomery G. M. J. and Hughes C. G. 1953. *Manual of cane growing*. Australian Agricultural and Livestok Series.96 p.
- Kilmer V. J., Younts S. E. and Brady N. C. 1968. *The Role of Potassium in Agricultural*. Amer. Soc. Agron. Madison, USA. 236 p.

- Kouri F. J. B., Benítez G. M. J., Rodríguez S. O., Ancheta N. and Ruiz D. A. 1987. Somaclonal variation in a sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cell suspension. Plant Biology Department. National Center for Scientific Research. Habana, Cuba. 285-286 p.
- Krishnamurthi M. and Tlascal J. 1974. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* L. var. Pindar subclones from tissue cultures. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech. 15:130-137.
- Krishnamurthi M. 1977. Sugarcane Improvement Through Tissue Culture. Proc. 16 Congress Int. of Sugarcane Technologists. 23-28.
- Lee T. S. G. 1986. Multiplication of sugarcane by apex culture. Physiology Section – PLANASUCAR. Araras SP-Brasil. Turrialba. Vol. 36, No. 2, pp. 231-236.
- Lee T. S. G. 1987. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). PLANALSUCAR. Araras-Sp. Brasil. Plant cell. Tissue and organ culture. 10:47-55.
- Liu Ming-Chin and Chen Wuen-Huei. 1976. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. Creation of genetic variation through callus culture. I. Euphytica 25:393-403.
- Liu Ming-Chin and Chen Wuen-Huei. 1978. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. II. Performance and yield potential of callus derived lines. Euphytica. 27:273-282.
- López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Pérez-Torres A., Rampey R. A., Bartel B., and Herrera-Estrella L. 2005. An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in Arabidopsis. Plant Phys. 137: 681–691.
- López P. C. 1990. Medios de cultivo. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Producción y Protección Vegetal (FAO). No. 105. 112 p.
- Lovatt C. J. 1985. Evolution of the xylem resulted in a requirement for boron in the apical meristemos of vascular plants. New Phytol. 99: 509-522.
- Lovatt C. J. and Dugger W. M. 1984. Boron. Pp. 389-421. In: E. Frieden (ed.). Biochemistry of the essential ultra-trace elements. Plenum, New York.
- Marcar N. E. And Graham R. D. 1987. Genotypic variation for manganese efficiency in wheat. J. Plant Nutr. 10: 2049-2055.
- Marin S. R. M. 1989. Tesis Ingeniero Agrónomo. Problemas Especiales de Experimentación Cañera. Universidad Autónoma de Chapingo, México. Pp 4, 71.

- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press. London, U. K. 889 p.
- Marschner H. and Ritcher C. 1973. Accumulation and translocation from K^+ , Na^+ and Ca^{2+} whit offer to individual root zones of corn-germ-plant. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 135:1-15.
- Massieu Y., Chauvet M., Castañeda G. y Barojas R. E. 1992. Aplicaciones de la biotecnología a la floricultura de México: Efectos en el empleo 235-279. En: la biotecnología y sus repercusiones socioeconómicas y políticas. Aboites M. G. *et al.* Instituto de investigaciones sociales de la UNAM. Departamento de sociología UNAM-AZC. Instituto de investigaciones económicas. UNAM. México.
- Méndez S. R. 1994. Micropropagación de caña de azúcar de yemas y ápices. Informe Técnico del Programa de Cultivo de Tejidos. SARH, INIA, CAEZACA. México. 36 p.
- Mengel K. and Kirkby E. A. 1987. Principles of plant Nutrition. International Potash Institute. Bern, Switzerland. 116 p.
- Milivojevic D. B. and Tyszkiewicz E. 1992. Effect of light quality on the organization of chloroplast thylakoids of *Pinus nigra*. Arn. J. Plant Physiol. 139:574-578.
- Miller G. W., J. Pushnik and Welkie G. W. 1984. Iron chlorosis, a world wide problem: The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. J. Plant Nutr. 7:1-22.
- Montoya H. y Luz M. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Seccional Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía. 77 pp.
- Moog P. R. and Brüggeman W. 1994. Iron reductase systems on the plant plasma membrane-A review. Plant Soil, 165: 421-260.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-497.
- Nable R. O., Bar-Akiva A. and Loneragan J. F. 1984. Functional manganese requerimenr and its use as critical value for diagnosis of manganese deficiency in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L. cv. Seaton Park). Ann. Bot. 54:39-49.
- National Parks Board. 2007. Revisión de Literatura. <http://www.nparks.gov.sg/>
- Ness P. J. and Woolhouse H. W. 1980. RNA synthesis in *Phaseolus* chloroplasts. I. Ribonucleic acid synthesis and senescing leaves. J. Exp. Bot. 31: 223-233.
- Nickell L. G. 1965. Tissue and cell culture for sugarcane research. Proc. Inter. Sugarcane Tech. 12:887-892.

- Nickell L. G. 1977. Crop improvement in sugarcane studies using in vitro methods. *Crop. Sci.* 17:717-719.
- Nuñez M. 2004. Effect of Spirostane Analogues of Brassinosteroids on Callus Formation and Plant Regeneration in lettuce (*Lactuca sativa*). Page 1. 78: 97-99
- Ochse J. J., Soule M. J., Dijkman M. J. y Wehlburg C. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Limusa-Wiley. S. A. México. 97 p.
- Ojeda E. M. A. 1978. Tesis de Maestría en Ciencias. Estudio sobre el Establecimiento de Citocultivos e Inducción de Diferenciación en Caña de Azúcar. Colegio de Postgraduados Chapingo, Texcoco. México. Pp. 8, 12-13, 25-28, 31-32, 66.
- Orozco R. R. S. 1993. Propagación *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) y su adaptación a invernadero. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. 187p.
- Ortiz E. and Zerega M. 1978. Manejo de la caña de azúcar en la zona de influencia de la Estación experimental Yaracuy. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (20) 36-38.
- Pacheco-Sánchez M., Lozoya-Saldaña H. y Colinas-León M. T. 2003. Reguladores de crecimiento y pretratamiento con frío en la androgénesis *in vitro* de *Solanum iopetalum* L. *Agrociencia* 37: 257-265.
- Payán A. F., Carmen O. y Tascon G. 1977. Técnicas para la propagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante el cultivo de tejidos y yemas. *Acta agronómica* 27 (1-4): 43:79.
- Perrot-Rechenmann C. and Napier R. M. 2005. Auxins. *Vitamins and hormones* 72: 203-233.
- Pier P. A. and Berkowitz G. A. 1987. Modulation of water stress affects on photosynthesis by altered leaf K⁺. *Plant Physiol.* 85: 655-661.
- Pierik L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Pibeam D. J. and Kirkby E. A. 1983. The physiological role of boron in plants. *J. Plant Nutr.* 6: 563-582.
- Plant Biology Department. National Center for Scientific Research. Habana, Cuba.
- Pokojska-Burdziej A. 1981. The effect of carbon and nitrogen sources on auxins and gibberellin-like substances synthesis by bacteria isolated from the roots of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). *Acta Microbiol Pol.* 1981;30(4):347-54.
- Poehlmon M. J. y Allen S. D. 2003. Mejoramiento de las cosechas. Editorial Limusa. 2da Edición. México D. F. 68 p.

- Puzina T. I. 2004. Effect of zinc sulfate and boric acid on the hormonal status of potato plants in relation to tuberization. *Russian J. Plant Physiol.* 51: 209-215.
- Rodríguez F. 1992. Fertilizantes y nutrición vegetal. A. G. T. México. 79 p.
- Romano A., Noroña C. and Martins-Loucao M. A. 1995. Role of carbohydrate in micropropagation in Cork oak. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40:159-167.
- Salgado G. S., Bucio A. L., Riestra D. y Lagunes-Espinoza L. C. 2003. Caña de azúcar: hacia un manejo sustentable. ISBN 968-839-331-2. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados-Instituto para el Desarrollo de Sistemas de producción del Trópico Húmedo de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 384 p.
- Salisbury F. B. y Ross C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericano. S.A. de C.V. México. 236 p.
- Sandmann G. and Börger P. 1983. The enzymatological function of heavy metals and their role in electron transfer processes of plants..563-596. *In: A. Lauchli and R. L. Bielecki (eds.). Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 15B. Inorganic Plant Nutrition New Series Springer Verlag. Berlin, Germany.*
- SAS. 2000. SAS's users guide. Statistics. Version 8.1. SAS Institute Inc. Cary, N. C., USA. 1290 p.
- Sauvaire D. y Galzy R. 1981. Propagación *in vitro* de bastones de caña de azúcar. Acción de la relación auxina/citocinina. *Agroinómia Tropical.* Maracay, Venecia. 36:1-6369.
- Shanjani P. S. 2003. Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. *International J. Agric. Biol.* 5 (4): 419-422.
- Schugurensky A. y Díaz L. 2001. Revista Facultad de Agronomía y Zootecnia. Identificación de clones micropropagados de caña de azúcar (*Saccharum* sp) por electroforesis de isoenzimas. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. 38 p.
- Scowcroft W. R. and Larkin P. J. 1982. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. P 111-121. ISSN 0167.
- Soberón, J. R., Quiroga E. N., Sampietro, A. R. y Vattuone M. A. 2007. Auxinas. Hipertextos del área de la biología. Universidad Nacional del Nordeste. Fac. Ciencias Agrarias. Corrientes, República Argentina. www.biologia.edu.ar
- Suárez R. R. y Marín R. 2003. Caña de azúcar y sostenibilidad. Enfoques y experiencias cubanas. Ministerio de azúcar. MINAZ. Cuba. 47 p.
- Tabatabai M. A. and Dick W. A. 1979. Distribution and stability of pyrophosphatase in soil. *Soil Biol. Biochem.* 11: 655-659.

- Terry N. and Abadía J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.* 9: 609-646.
- Unión Nacional de Cañeros. 2007. Revisión de literatura de la situación actual de la caña de azúcar en México. http://www.Unión Nacional de Cañeros, A.C. CNPR_archivos/principal.htm
- Usui K., Okabe K., Ramírez A. E. y Pernillo R. V. 1996. Principios Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Guatemala. 166 p.
- Van der Luit A. H., Olivari C., Haley A., Knight M. R. and Trewavas A. J. 1999. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 121: 705–714.
- Vallee B. L. and Auld D. S. 1990. Zinc coordination, function and structure of zinc enzyme and other proteins. *Biochem.* 29: 5647-5659.
- Velásquez M., González A. y Mata F. 1988. Tipo de sombreado y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *Annona muricata* L. *Rev. Fac. Agron.*, vol.21, no.1, p.12-18. ISSN 0378-7818.
- Walker C. J. and Weinstein J. D. 1991. Further characterization of the magnesium chelatase in isolated developing cucumber chloroplasts. *Plant Physiol.* 95: 1189-1196.
- Wu W., Peters J. S. and Berkowitz G. A. 1991. Surface charge mediated effects of Mg^{2+} on K^+ flux across the chloroplast envelope are associated with regulation of stromal pH and photosynthesis. *Plant Physiol.* 97: 580-587.

9. APENDICE

Cuadro 1A. Compuestos inorgánicos del medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962) utilizado en la inducción de brotes de Caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

Componentes	Cantidad (mg L ⁻¹)
Inorgánicos	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .H ₂ O	370
MnSO ₄ .H ₂ O	16
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
CoCl ₂ .H ₂ O	2.4
KI	0.8
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2.4
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ B ₃ O	6.2
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ .EDTA	37.3
Orgánicos	
Tiamina	40
Inositol	100

Cuadro 2A. Concentraciones de componentes orgánicos e inorgánicos en medios de cultivo.

Componentes	Knop (1865)	Heller (1959)	Eriksson (1959)	MS (1962)	White (1963)	Nitsch (1967)	Gamborg (1968)	Nagata y Takebe (1971)	Lloyd y McCown (1980)
Composición Mg L⁻¹									
NH ₄ NO ₃	-	-	1.200,	1.650,	-	720,0000	-	825,0000	400,0000
KNO ₃	250,0000	-	1.900,	1.900,	80,0000	950,0000	2.527,50.	950,0000	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	75,0000	440,0000	440,0000	-	-	150,0000	220,0000	96,0000
CaCl ₂	-	-	-	-	-	166,0000	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,0000	250,0000	370,0000	370,0000	720,0000	185,0000	246,5000	1.233,	370,0000
KH ₂ PO ₄	250,0000	-	340,0000	170,0000	-	68,0000	-	680,0000	170,0000
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	990,0000
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	134,0000	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1.000	-	-	-	300,0000	-	-	-	556,0000
NaNO ₃	-	600,0000	-	-	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	200,0000	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₂ .H ₂ O	-	125,0000	-	-	19,0000	-	150,0000	-	-
KCl	-	750,0000	-	-	65,0000	-	-	-	-
KI	-	0,0100	-	0,8300	0,7500	-	0,7500	0,8300	-
H ₃ BO ₃	-	1,0000	0,6300	6,2000	1,3000	10,0000	3,0000	6,2000	6,2000
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	0,1000	2,2300	22,3000	7,0000	25,0000	-	22,3000	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	-	-	-	-	3,0000	-	16,9000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	1,0000	-	8,6000	3,0000	10,0000	2,0000	-	8,6000
ZnSO ₄ .4H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	8,6000	-
Zn.Na ₂ .EDTA	-	-	15,0000	-	-	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	0,0025	0,2500	-	0,2500	0,2500	0,2500	0,2500
MoO ₃	-	-	-	-	0,0001	-	-	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0,0300	0,0025	0,0250	0,0010	0,0250	0,0250	0,0250	0,2500
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	0,0025	0,0250	-	-	0,0250	-	-
CoSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	0,0300	-
AlCl ₃	-	0,0300	-	-	-	-	-	-	-
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	0,0300	-	-	-	-	-	-	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	1,0000	-	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	27,8000	27,8000	27,8	27,8000	-	27,8000	27,8000
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	-	-	37,3000	37,3000	37,3	37,3000	-	37,3000	37,3000
Sequestrene 330Fe	-	-	-	-	-	-	28,0000	-	-
Inositol	-	-	-	100,0000	-	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
Acido Nicotínico	-	-	0,5000	0,5000	0,5000	5,0000	1,0000	-	0,5000
Piridoxina HCl	-	-	0,5000	0,5000	0,1000	0,5000	1,0000	-	0,5000
Tiamina HCl	-	-	0,5000	0,1000	0,1000	0,5000	10,0000	1,0000	1,0000
Glycina	-	-	2,0000	2,0000	3,0000	2,0000	-	-	2,0000
Acido Fólico	-	-	-	-	-	0,5000	-	-	-
Biotina	-	-	-	-	-	0,0500	-	-	-
Sacarosa	-	-	4%	3%	2%	2%	2%	1%	2%
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	12,7%	-

Cuadro 3A. Tamaño de brotes (TB) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.

AIA (mg L ⁻¹)	Tamaño de brotes (TB) cm	Desviación estándar
0.0	1.18	0.54
0.5	2.50	0.78
1.0	1.93	1.47
1.5	2.76	2.07
2.0	3.05	2.08

Cuadro 4A. Número de hojas (NH) emitidas por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.

AIA (mg L ⁻¹)	Número de Hojas (NH)	Desviación estándar
0.0	4.52	0.73
0.5	4.20	0.64
1.0	3.24	2.04
1.5	3.45	2.52
2.0	3.56	2.06

Cuadro 5A. Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la auxina AIA en el medio de cultivo.

Niveles de AIA mg L ⁻¹	Tamaño de hojas (TH) cm	Desviación estándar
0.0	1.54	0.62
0.5	1.92	0.60
1.0	1.23	0.95
1.5	1.77	1.37
2.0	2.05	1.36

Cuadro 6A. Comparación de medias de la variable número de brotes (NB) en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas con diferentes niveles de la auxina AIA en el medio de cultivo.

AIA (mg L ⁻¹)	Diferencia entre medias	Simultáneo 95 % Límites de confianza	Significancia
0.5 – 1.0	20.40	08.18 32.62	***
0.5 – 1.5	26.34	13.72 38.98	***
0.5 – 2.0	32.92	20.70 45.14	***
0.0 - 1.0	19.02	06.53 31.50	***
0.0 – 1.5	24.96	12.08 37.85	***
0.0 – 2.0	31.54	19.05 44.02	***
1.0 – 0.5	-20.40	-32.62 -08.18	***
1.0 – 0.0	-19.02	-31.50 -06.53	***
1.0 – 2.0	12.52	00.30 24.74	***
1.5 – 0.5	-26.35	-38.98 -13.72	***
1.5 – 0.0	-24.97	-37.85 -12.08	***
2.0 – 0.5	-32.92	-45.14 -20.70	***
2.0 – 0.0	-31.54	-44.02 -19.05	***
2.0 – 1.0	-12.52	-24.74 -00.30	***

Las comparaciones importantes del nivel de 0.05 están indicadas por ***.

Cuadro 7A. Número de brotes (NB) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.

Tratamientos	KIN (mg L ⁻¹)	NB cm	Desviación estándar
T1 al T5	0.0	32.73	20.45
T6 al T10	0.5	37.12	19.77
T11 al T15	1.0	32.59	20.53
T16 al T20	1.5	30.96	22.52
T21 al T25	2.0	26.32	19.47

Cuadro 8A. Tamaño de brotes (TB) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.

Tratamientos	Niveles de KIN mg L ⁻¹	TB cm	Desviación estándar
T1 al T5	0.0	2.03	1.68
T6 al T10	0.5	2.72	1.54
T11 al T15	1.0	2.34	1.39
T16 al T20	1.5	2.53	1.56
T21 al T25	2.0	2.47	1.66

Cuadro 9A. Número de hojas (NH) emitidas por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.

Tratamientos	Niveles de KIN mg L ⁻¹	NH número	Desviación estándar
T1 al T5	0.0	3.13	1.76
T6 al T10	0.5	4.32	1.51
T11 al T15	1.0	3.77	1.50
T16 al T20	1.5	3.84	1.99
T21 al T25	2.0	3.84	2.05

Cuadro 10 A. Tamaño de hojas (TH) emitidos por vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 crecidas en medios con diferentes concentraciones de la citocinina KIN en el medio de cultivo.

Tratamientos	Niveles de KIN mg L ⁻¹	TH cm	Desviación estándar
T1 al T5	0.0	1.36	1.07
T6 al T10	0.5	1.91	1.00
T11 al T15	1.0	1.64	0.92
T16 al T20	1.5	1.80	1.13
T21 al T25	2.0	1.78	1.14

Cuadro 11A. Comparación de medias de la variable número de brotes (NB) en vitroplantas de caña de azúcar variedad ITV 92-1424 como efecto de las interacciones entre los factores AIA y KIN.

Comparaciones entre tratamientos	Diferencia entre medias	Simultáneo 95 %	Límites de confianza	Significancia
T4 - T25	40.40	03.362	77.438	***
T4 - T21	42.60	05.562	79.638	***
T4 - T23	44.60	07.562	81.638	***
T4 - T19	45.20	08.162	82.238	***
T4 - T24	50.00	12.962	87.038	***
T4 - T20	51.80	14.762	88.838	***
T7 - T21	38.60	01.562	75.638	***
T7 - T23	40.60	03.562	77.638	***
T7 - T19	41.20	04.162	78.238	***
T7 - T24	46.00	08.962	83.038	***
T7 - T20	47.80	10.762	84.838	***
T6 - T23	37.60	00.562	74.638	***
T6 - T19	38.20	01.162	75.238	***
T6 - T24	43.00	05.962	80.038	***
T6 - T20	44.80	07.762	81.838	***
T10 - T24	40.40	03.362	77.438	***
T10 - T20	42.20	05.162	79.238	***
T3 - T24	39.60	02.562	76.638	***
T3 - T20	41.40	04.362	78.438	***
T8 - T24	38.00	00.962	75.038	***
T8 - T20	39.80	02.762	76.838	***
T2 - T24	37.60	00.562	74.638	***
T2 - T20	39.40	02.362	76.438	***
T9 - T24	37.20	00.162	74.238	***
T9 - T20	39.00	01.962	76.038	***
T25 - T4	-40.40	-77.438	-03.362	***
T21 - T4	-42.60	-79.638	-05.562	***
T21 - T7	38.600	5.638	-01.562	***
T23 - T4	44.600	1.638	-07.562	***
T23 - T7	40.600	7.638	-03.562	***
T23 - T6	37.600	4.638	-00.562	***
T19 - T4	45.200	2.238	-08.162	***
T19 - T7	41.200	8.238	-04.162	***
T19 - T6	38.200	5.238	-01.162	***
T24 - T4	50.000	7.038	-12.962	***
T24 - T7	46.000	3.038	-08.962	***
T24 - T6	43.000	0.038	-05.962	***
T24 - T10	40.400	7.438	-03.362	***
T24 - T3	39.600	6.638	-02.562	***
T24 - T8	38.000	5.038	-00.962	***
T24 - T2	37.600	4.638	-00.562	***
T24 - T9	37.200	-74.23	-00.162	***
T20 - T4	51.800	-88.838	-14.762	***
T20 - T7	47.800	-84.838	-10.762	***
T20 - T6	44.800	-81.838	-07.762	***
T20 - T10	42.200	-79.238	-05.162	***
T20 - T3	41.400	-78.438	-04.362	***
T20 - T8	39.800	-76.838	-02.762	***
T20 - T2	39.400	-76.438	-02.362	***
T20 - T9	39.000	-76.038	-01.962	***

Las comparaciones importantes del nivel de 0.05 están indicadas por ***.