



Optimización del proceso de desinfección *in vitro* y aclimatación de la caña de azúcar (*Sacharum* spp. híbrido) var. MEX 69-290

Perla Cristal León-Alfonzo^{1,2}, Leobardo Iracheta-Donjuan^{1*}, Jorge Luis Méndez-Sántiz³, José Luis Solís-Bonilla¹

¹Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

²Universidad Tecnológica de la Selva. Ocosingo, Chiapas, México.

³Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar, A. C. (CIDCA, A.C.). Tuxtla Chico, Chiapas, México.

Resumen

Las etapas de desinfección de ápices de caña de azúcar y de aclimatación, no son siempre efectivas. El éxito de la desinfección depende de la variedad, la carga de microorganismos endófitos y la sensibilidad a los desinfectantes, que podrían causar oxidación de tejidos. Plántulas enraizadas *in vitro* se usan regularmente para la aclimatación, en donde se generan hojas y raíces poco funcionales. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue optimizar la desinfección de ápices de caña de azúcar durante su establecimiento *in vitro* y lograr la aclimatación de brotes sin raíz, directamente de la fase de multiplicación. En la etapa de desinfección se utilizaron ápices de brotes de la variedad MEX 69-290, donde se probaron 12 tratamientos producto de la combinación de tres métodos de desinfección (con NaClO, NPsAg, gentamicina), la presencia o ausencia de agua de coco y dos concentraciones de fitoreguladores. Mientras que en la etapa de aclimatación se utilizaron brotes sin raíz generados directamente de la etapa de multiplicación, los cuales fueron sometidos a la interacción de la aplicación o no de ácido indolbutírico en la base de los brotes, la presencia o ausencia de micorriza en el sustrato y la aplicación o no de 24-epibrasinólida. En la desinfección de ápices de caña de azúcar, la adición de gentamicina al medio mejoró la desinfección solo durante los primeros 14 días. Sin embargo, el único tratamiento con los mayores niveles de asepsia, supervivencia y respuesta morfogénica, a los 14 y 63 días, fue el NaClO al 3% por 15 min + NaClO al 0.06% por 5 min y con BAP (1.68 mg L⁻¹) + AIA (0.175 mg L⁻¹) en el medio de cultivo. Fue posible la aclimatación del 75% de los brotes, provenientes directamente de la etapa de multiplicación, mediante la adición a la base de los brotes la auxina AIB, 1.5 g de micorriza al hoyo de siembra y dos aplicaciones en hojas de 1 mL de 0.0096 mg L⁻¹ de 24-epibrasinólida.

Palabras clave:

Aclimatación
Epibrasinólida
Gentamicina

Rhizophagus irregularis

Keywords:

Acclimatization
Epibrassinolide
Gentamicin

Rhizophagus irregularis

Optimization of *in vitro* disinfection process and acclimatization of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) var. MEX 69-290

* Autor para correspondencia:

Campo Experimental
Rosario Izapa del Instituto
Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias.
Carretera Tapachula-
Cacahoatán Km 18. C.P.
30870.
Tuxtla Chico, Chiapas,
México.
Teléfono: + 52 9621059535.
Correo-electrónico:
iracheta.leobardo@inifap.gob.mx

Abstract

The phase of disinfection of sugar cane apices and the acclimatization phase are not always effective. The success of disinfection depends on the variety, the load of endophyte microorganisms, and the sensitivity to disinfectants, which cause tissue oxidation. While, *in vitro* rooted seedlings are using for acclimatization, where functional leaves and roots are poorly developed. Therefore, the aim of this work was to optimize the disinfection of sugar cane apices during their *in vitro* establishment and achieve acclimatization of rootless shoots directly from the multiplication phase. In the disinfection phase, shoot apices of variety MEX 69-290 were used, testing 12 treatments resulting from the combination of three disinfection methods (with NaClO, NPsAg, gentamicin), the presence or absence of coconut water, and two concentrations of plant growth regulators. In the acclimatization phase, rootless shoots generated directly from the multiplication phase were used, subjected to the interaction of applying or not applying indolebutyric acid at the base of shoots, presence or absence of mycorrhiza in the substrate, and application or non-application of 24-epibrassinolide. In the disinfection of sugar cane apices, adding gentamicin to the medium improved disinfection only for the first 14 days. However, the treatment with the highest levels of asepsis, survival, and morphogenic response at 14 and 63 days was NaClO at 3% for 15 min + NaClO at 0.06% for 5 min with BAP (1.68 mg L⁻¹) + IAA (0.175 mg L⁻¹) in the culture medium. It was possible to acclimatize 75% of the shoots directly from the multiplication stage by adding AIB auxin at the base of shoots, 1.5 g of mycorrhiza per planting hole, and two leaf applications of 1 mL of 0.0096 mg L⁻¹ 24-epibrassinolide.

1. Introducción

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), es uno de los cultivos agrícolas más importantes del planeta. México es considerado como el 7° productor a nivel mundial y uno de los de mayor importancia en la producción de azúcar (García y Serrano, 2020). Tan solo a finales del año 2023 la superficie cultivada fue 854,301.43 ha, las cuales generaron una producción con valor de casi 53 mil millones de pesos (SIAP, 2024).

El establecimiento y renovación de plantaciones de caña de azúcar en campo involucra convencionalmente el uso de yemas; lo que acarrea problemas de agotamiento de las variedades, así como acarreo y diseminación de algunas plagas y enfermedades por el tránsito sin control fitosanitario de las semillas o yemas (Caamal y Bello, 2014). Por lo anterior, el uso de las técnicas biotecnológicas, como la propagación de vitroplantas por cultivo de tejidos vegetales, ha sido desde hace algunos años una opción para contrarrestar los problemas de producción masiva de plantas certificadas. La técnica tiene su soporte en la totipotencia celular o la capacidad de la célula vegetal para regenerar una planta completa; mediante el cultivo de cualquier tejido vivo de la planta, en un medio nutritivo artificial bajo condiciones asépticas y en un ambiente controlado (Díaz et al., 2020). El cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar consta de cinco etapas: E0) preparación de las plantas madre, E1) establecimiento aséptico e inducción de la organogénesis, E2) multiplicación, E3) crecimiento y enraizamiento, y E4) aclimatación.

El establecimiento aséptico y la inducción de la organogénesis es una etapa de las más complicadas, debido a que consiste en la implantación de meristemas o ápices meristemáticos desinfectados exitosamente, en medio de cultivo para el desarrollo del brote, donde cada meristemo que induzca la caulogénesis, o formación de nuevos brotes, es identificado como una "línea" con fines de trazabilidad de cada vitroplanta producida (Díaz et al., 2020). Sin embargo, el porcentaje de éxito en la desinfección de los tejidos iniciales y el explante final, varía dependiendo de las condiciones de la planta madre, si proviene de campo o de invernadero, del genotipo y sobre todo de la microbiota asociada al suelo y a la misma planta, la cual varía dependiendo de las condiciones ambientales de cada región. Por tal motivo, las aplicaciones de protocolos de desinfección no siempre son eficientes para la descontaminación de algunas variedades, de tal forma que se pueden presentar no solo problemas de elevada contaminación, si no también elevada oxidación de los tejidos por sensibilidad a los desinfectantes. Al respecto, algunos trabajos han reportado porcentajes de contaminación del 30% de explantes establecidos *in vitro* en ciertas variedades, mientras que en otras se presenta hasta el 50% de contaminación en los primeros 21 días después del establecimiento, con presencia de oscurecimiento de los explantes en desinfectantes como el hipoclorito de sodio (NaClO) (Rangel-Estrada et al., 2016); porcentaje que en ocasiones puede elevarse en el transcurso

de los días. Sin embargo, dentro de los agentes contaminantes que se pueden presentar, los más comunes corresponde a la contaminación bacteriana de origen sistémico, que no puede ser eliminada por la desinfección superficial con NaClO; por lo que la incidencia de bacterias es uno de los problemas frecuentes no solo en la etapa de inducción, sino también durante la multiplicación y enraizamiento (Alvarado-Capó et al., 2003; Rangel-Estrada et al., 2016). Se ha planteado, incluso, que el uso de antibióticos como la gentamicina en el medio de cultivo, podría asegurar el 92 % de ápices asépticos en algunas variedades; de igual forma, el empleo de nanopartículas de plata, combinado con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento podría mejorar la asepsia y al mismo tiempo promover el crecimiento (Chávez-García et al., 2020; Niubó et al., 2004). Por otra parte, una vez superados los problemas de contaminación, los brotes inducidos son multiplicados en medios semisólidos o en sistemas de inmersión temporal para incrementar la productividad y disminuir el costo de producción. Sin embargo, para obtener plantas completamente aclimatadas, los brotes multiplicados deberán pasar por la etapa de crecimiento y enraizamiento, la cual implica la individualización de los brotes y su cultivo en medio semisólido por un tiempo de 15 a 30 días; lo anterior deberá asegurar porcentajes de aclimatación del 85 a 98% (Caamal y Bello, 2014; Pineda et al., 2018; Rangel-Estrada et al., 2016). Tal aclimatación permitirá que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos (Preece y Sutter, 1991); etapa fundamental en la producción de plantas, toda vez que de ella depende la calidad final de las plantas propagadas *in vitro* (Agramonte et al., 1998); por lo que es necesario la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*. De allí que la elección del sustrato, la proporción adecuada de los componentes de la mezcla, la fertilización, así como la regulación de la temperatura y humedad, sean los principales factores que afectarán la aclimatación (Abad, 1989; Díaz et al., 2004). Si bien, la aclimatación involucra la formación de nuevas hojas y raíces completamente adaptada a las nuevas condiciones en invernadero, también es cierto que las hojas y raíces generadas durante la etapa de crecimiento y enraizamiento *in vitro* no son completamente funcionales, lo cual en muchas ocasiones en lugar de significar una ventaja para la aclimatación se convierten en obstáculos para alcanzar una adaptación más rápida y eficiente. Además, dicha fase de enraizamiento *in vitro* requiere de tiempo, recurso humano y financiero; es una etapa que en otros cultivos *in vitro* se ha suprimido, de tal forma que al evitar el enraizamiento *in vitro* ha implicado un ahorro de tiempo y recursos (Cruz et al., 2012), lo que economiza el proceso de producción masiva de caña de azúcar. En algunos cultivos, como el banano y el café, se ha logrado eliminar la etapa de enraizamiento en brotes y de germinación de embriones con la paliación de 24-epibrasinólida, o bien con la combinación de

brasinoesteroides con el uso de micorrizas (Cruz et al., 2012; Del Castillo et al., 2010).

Es por ello que, el objetivo de esta investigación fue optimizar la desinfección de ápices de caña de azúcar durante el establecimiento *in vitro* con el uso de gentamicina, nanopartículas de plata y fitorreguladores, así como la aclimatación de brotes sin raíz, directamente de la fase de multiplicación, mediante el uso auxinas, micorrizas y epibrasinólida.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material biológico

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa del INIFAP. El material biológico para el experimento de desinfección correspondió a 120 puntas de caña de azúcar de la variedad MEX 69-290, cortadas con una longitud de 0.6 m, proporcionados por Grupo Porres, recolectadas en el Campo Experimental del Ingenio de Huixtla, ubicado en el km. 7 carretera Obregón-Mazatán, Chiapas, México. Para el experimento de aclimatación, se utilizaron 64 brotes multiplicados *in vitro* durante siete meses, provenientes de los ápices del experimento de desinfección, individualizados, sin raíz, con diámetro basal de 6 mm, altura de 20 cm de la base a la punta de la hoja más grande y con tres a cuatro hojas.

2.2. Optimización de la desinfección de ápices

En el laboratorio se realizó un despeje de hojas envolventes a las puntas de caña, hasta obtener puntas de 30 cm. Estas fueron lavadas con agua y jabón, para después sumergir en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%, luego se enjuagaron para su empaque en papel estraza y su refrigeración a 5 °C durante 24 h (únicamente 80 puntas). En las 40 puntas restantes se aplicó un segundo despaje de hojas y un corte para obtener segmentos de 15 cm.

2.2.1. Métodos de desinfección

Una vez obtenidas las 40 puntas de 15 cm, estas se colocaron en una solución de nanopartículas de plata AgROVIT-CP (NPsAg) a razón de 0.005 mL L⁻¹, de tal forma que solo un centímetro basal de las puntas estuvo sumergido en dicha solución. En estas condiciones, las 40 puntas fueron almacenadas en refrigeración, junto a las 80 puntas restantes, a 5 °C durante 24 h.

Transcurridas 24 h, se aplicaron tres métodos de desinfección de las puntas. Para el primer método, se tomaron 40 puntas (sin NPsAg). A estas se les cortó la parte basal del ápice con oxidación, hasta dejar ápices de 15 cm. En condiciones asépticas estos fueron sometidos a una solución de NaClO al 3% durante 15 min. Después de tres enjuagues con agua destilada esterilizada, se retiraron aproximadamente seis capas de hojas envolventes, hasta obtener ápices de 1.5 cm de base a punta (0.5 base y 1 cm de hojas). Éstos se colocaron en una solución de antioxidante esterilizada (100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 150 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 30 g L⁻¹ de sacarosa) durante 10 min, y se enjuagaron con agua destilada esterilizada. Finalmente, los ápices se sumergieron a una

solución de NaClO al 0.06% durante 15 min, y luego se enjuagaron por tres ocasiones. Los ápices desinfectados por este método fueron establecidos en los diferentes medios de cultivo.

Para el segundo método de desinfección, se utilizaron las 40 (puntas refrigeradas con la solución de NPsAg; las cuales, bajo condiciones asépticas se retiraron aproximadamente seis capas de hojas envolventes, hasta obtener ápices de 1.5 cm de base a punta (0.5 base y 1 cm de hojas). En este caso, los ápices se colocaron en una solución de 5 mL L⁻¹ de antioxidante PPM (Plant Preservative Mixture: 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolona 0.13%; 2-metil-3(2H)-isotiazolona 0.04%) durante 10 min, y posteriormente se aplicó un enjuague con agua destilada esterilizada. Posteriormente, las puntas se sumergieron en la solución de NaClO al 0.06% durante 15 min y finalmente se enjuagaron tres ocasiones; antes del establecimiento de los ápices en los diferentes medios de cultivo.

El tercer método de desinfección consistió en el uso de 40 ápices (sin NPsAg). Los cuales se procesaron igual que el primer método de desinfección con NaClO al 3% durante 15 min, hasta la obtención de ápices 1.5 cm de base a punta (0.5 base y 1 cm de hojas). La diferencia consistió en que en este método se utilizó el PPM como desinfectante, tal y como se señala en el segundo método de desinfección. Adicionalmente, los ápices obtenidos con este método fueron establecidos en los diferentes medios de cultivo adicionados con gentamicina a 35 mg L⁻¹ por 14 días.

2.2.2. Medios de cultivo

Los ápices desinfectados fueron establecidos en cuatro medios de cultivo. En todos los casos el medio base consistió en el medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962), sin glicina y adicionado con las diferentes concentraciones de promotores orgánicos o fitorreguladores. El pH fue ajustado a 5.6. Los medios se dispensaron en tubos de ensayo con 15 mL de medio de cultivo y posteriormente se esterizaron a 121 °C y 1.1 kg cm² durante 20 min. Los cuatro medios de cultivo consistieron en evaluar la adición de agua de coco, como promotor del crecimiento, en las concentraciones de 0 y 150 mL L⁻¹; así como dos condiciones de fitorreguladores, que consistieron en la adición al medio de 6-bencilaminopurina (BAP a 0.5 mg L⁻¹) de acuerdo con Caamal y Bello (2014) y por otro lado la combinación de BAP (1.68 mg L⁻¹) + ácido indolacético (AIA 0.175 mg L⁻¹) según Rangel-Estrada et al. (2016).

2.2.3. Tratamientos y variables respuesta

La combinación de los tres métodos de desinfección, las dos concentraciones de agua de coco en el medio de cultivo y las dos condiciones de fitorreguladores arrojaron un total de 12 tratamientos (Cuadro 1). Cada uno contó con 10 repeticiones, donde una repetición y unidad experimental consistió en un brote en un tubo de ensayo con 15 mL de medio de cultivo líquido. Las repeticiones fueron incubadas en durante 14 días a 26±1 °C y fotoperiodo de 12 h, con una intensidad de 11.68 μmoles m⁻² s⁻¹. Transcurridos los 14 días, los brotes fueron subcultivados en su totalidad al medio MS solo con BAP a

0.5 mg L⁻¹ y sin gentamicina. El diseño experimental consistió en un completamente al azar; las variables respuesta fueron: porcentajes de contaminación, oxidación,

supervivencia y explantes con brotes (EB), así como el número de brotes por explante (NBE), la altura (cm) y el grosor (mm) a los 14 y 63 días después de la siembra.

Cuadro 1. Relación de tratamientos en función de la combinación del método de desinfección, agua de coco como promotor de crecimiento y fitoreguladores.

Tratamiento	Desinfectante	Agua de coco	Combinación de reguladores (mg L ⁻¹)
1	NaClO (3%) + NaClO (0.06%) testigo	Sin agua de coco	BAP (0.5)
2	NaClO (3%) + NaClO (0.06%)	Sin agua de coco	BAP (1.68) + AIA (0.175)
3	NaClO (3%) + NaClO (0.06%)	Agua de coco 15%	BAP (0.5)
4	NaClO (3%) + NaClO (0.06%)	Agua de coco 15%	BAP (1.68) + AIA (0.175)
5	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Sin agua de coco	BAP (0.5)
6	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Sin agua de coco	BAP (1.68) + AIA (0.175)
7	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Agua de coco 15%	BAP (0.5)
8	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Agua de coco 15%	BAP (1.68) + AIA (0.175)
9	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Sin agua de coco	BAP (0.5)
10	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Sin agua de coco	BAP (1.68) + AIA (0.175)
11	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Agua de coco 15%	BAP (0.5)
12	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Agua de coco 15%	BAP (1.68) + AIA (0.175)

Gen= Gentamicina.

2.3. Optimización de la aclimatación

2.3.1. Tratamientos de enraizamiento, micorriza y epibrasinólida

Los 64 brotes individualizados de caña de azúcar *in vitro* de la variedad MEX 69-290, fueron separados en dos grupos de 32. En el primer grupo, la parte basal fue sumergida en agua destilada y el segundo en una solución de ácido indolbutírico (AIB) a 10 mg L⁻¹, durante 1 h. Posteriormente los brotes de cada grupo se retiraron de las soluciones, y sin enjuagar, se sembraron en el sustrato. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba (Cosmo peat®), fibra de coco y agrolita; en una proporción 1:1:1. Se emplearon charolas de plástico negras de 52 cm de largo y 26 cm de ancho, con 200 orificios para siembra, los cuales fueron llenados con 6.8 g del sustrato a capacidad de campo. En el caso de los tratamientos donde se aplicó la micorriza, ésta se dispensó directamente en el hoyo de siembra a razón de 1.5 g. La micorriza utilizada fue *Glomus intraradices*, ahora reclasificada como *Rhizophagus irregularis* (micorriza INIFAP). Una vez establecidos los brotes en el sustrato, a los tratamientos de epibrasinólida se les aplicó por dos ocasiones 1 mL de una solución de 0.0096 mg L⁻¹ de 24-epibrasinólida (Epi), la primera al momento del trasplante y la segunda a los 7 d. Se evaluó un total de ocho tratamientos, resultado de combinar dos condiciones de AIB, micorriza y epibrasinólida. Cada tratamiento contó con ocho repeticiones. Estos fueron colocados en invernadero en charolas de siembra, cubiertos por 10 d con un domo de plástico transparente, el cual fue perforado para el intercambio gaseoso a los 15 d. Las charolas estuvieron bajo 50% de sombra y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 48 μmol s⁻¹ m⁻² durante los primeros 10 d y 500 μmol s⁻¹ m⁻² durante el resto del tiempo. El diseño experimental fue un completamente al azar con arreglo factorial. A los 23 d, las variables respuesta fueron el porcentaje de supervivencia, número de hojas nuevas (NHN), porcentaje de plantas con raíz (PR), número de raíces (NR),

número de raíces secundarias (NRS), longitud de raíz principal (LRP) y número de hijuelos (NHij).

2.4. Análisis de datos

En ambos experimentos los datos se analizaron mediante ANOVA, prueba de comparación de medias por Tukey (P<0.05) y correlación de Spearman, mediante el paquete estadístico SAS v. 9.3.

3. Resultados y Discusión

3.1. Optimización de la desinfección de ápices

El factor tipo de desinfección no tuvo efecto contundente en la contaminación a los 14 días en los diferentes tratamientos, ni a los 63 días, cuando los ápices ya se encontraban creciendo en el medio MS con solo 0.5 mg L⁻¹ de BAP (Cuadro 2 y 3). El tipo de desinfección solo tuvo un ligero efecto sobre la altura y grosor del brote durante los primeros 14 dds y sobre el grosor a los 63 dds. En tales casos, el método 3 de desinfección con gentamicina fue mejor. Aunque se esperaba mayor efecto sobre la contaminación que en la altura y grosor.

Como se aprecia en el Cuadro 2, los ápices a los 14 días, en los tratamientos T2, T10 y T12, presentaron el menor porcentaje de contaminación (50%), lo que repercutió en menor grado de oxidación, mayor supervivencia y mayores alturas, sobre todo en los tratamientos con gentamicina. La respuesta variable para la contaminación, propiciada casi en 100% por la presencia de bacterias, y la falta de un efecto claro del método de desinfección, indican la posibilidad que dichas bacterias sean endofíticas; por lo que al estar en el sistema vascular poco son afectadas por la desinfección superficial. Lo anterior explicaría que los tratamientos T10 y T12 con gentamicina, la cual puede ingresar al sistema vascular, hayan controlado mejor la contaminación.

Resultados similares fueron reportados por Rangel-Estrada et al. (2016); quienes consignaron porcentajes de contaminación bacteriana de 50 y 40% para las variedades

Laica 82-2220 y Q28-2, respectivamente, pero con menor concentración de NaClO (1.2%) a la utilizada en el presente trabajo (3%). Sin embargo, al aumentar la concentración de NaClO a 1.8 reportaron nula contaminación, aunque la supervivencia descendió de 70 a 50% y la oxidación se incrementó de 30 a 50%. Tales resultados difieren a lo

encontrado a los 14 días en el presente trabajo, para los tratamientos T2, T10 y T12, donde los porcentajes de oxidación fueron de 22 a 33% y los de supervivencia de 90 a 100% durante los primeros 14 días. Lo anterior podría significar que la variedad MEX 69-290 utilizada para este estudio es más tolerante al NaClO.

Cuadro 2. Variables respuesta de explantes de ápice de caña de azúcar Var. MEX 69-290 en diferentes tratamientos en medio líquido. Datos a los 14 dds en cada tratamiento.

Tratamiento	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Supervivencia (%)	EB (%)	NBE	Altura (cm)	Grosor (mm)
1. D1/SAC/BAP	70 bc	41.0 ab	90 a	0	0	3.02 bcd	2.8 ab
2. D1/SAC/BAP+AIA	50 c	22.5 b	90 a	0	0	2.72 bcd	2.5 ab
3. D1/CAC/BAP	90 ab	52.5 ab	70 a	0	0	2.66 bcd	2.3 b
4. D1/CAC/BAP+AIA	80 bc	62.5 ab	70 a	0	0	2.22 cd	2.2 b
5. D2/SAC/BAP	100 a	33.5 ab	80 a	0	0	2.34 cd	2.5 ab
6. D2/SAC/BAP+AIA	80 bc	42.7 ab	70 a	0	0	3.09 abc	2.8 ab
7. D2/CAC/BAP	70 bc	32.0 ab	80 a	0	0	2.08 cd	2.3 b
8. D2/CAC/BAP+AIA	100 a	83.0 a	60 a	0	0	2.05 d	1.9 b
9. D3/SAC/BAP	90 ab	36.5 ab	80 a	0	0	2.79 bcd	2.8 ab
10. D3/SAC/BAP+AIA	50 c	33.2 ab	100 a	0	0	4.08 a	3.5 a
11. D3/CAC/BAP	90 ab	68.0 ab	60 a	0	0	3.57 ab	2.9 ab
12. D3/CAC/BAP+AIA	50 c	31.5 ab	90 a	0	0	3.44 ab	2.7 ab
C.V.	12.69	19.69	12.97	NA	NA	24.39	27.69

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$).

D1. Método de desinfección 1=NaClO (3% 15 min) + (0.06% NaClO 5 min) o testigo. D2= NPsAg (0.005 mL L⁻¹) + NaClO (0.6% 3 min). D3= NaClO (3% 15 min) + Gentamicina (35 mg L⁻¹). SAC= Sin agua de coco y CAC= Con 15% de agua de coco.

En el caso del segundo método de desinfección con NPsAg (0.005 mL L⁻¹) y baja concentración de NaClO (0.6%, 3 min), no fue efectivo para el control de la contaminación. Estos resultados difieren con lo reportado por Chávez-García et al. (2020), donde concentraciones de 50 mg L⁻¹ de NPsAg controló en más de 90% la contaminación en ápices de gladiolo establecidos *in vitro*.

Sin embargo, una vez que transcurrieron los 14 días en los diferentes tratamientos, los ápices de cada uno fueron subcultivados al medio MS con 0.5 mg L⁻¹ de BAP; esto, con el fin de comprobar si los porcentajes de contaminación se mantenían al transcurrir 49 días más (63 días dds) sin la gentamicina de los tratamientos T9, T10, T11 y T12. Esta segunda evaluación arrojó que la contaminación de los ápices en la mayoría de los tratamientos se incrementó a un 90 a 100%, a excepción de los tratamientos T2, T10 y T12, en los cuales la contaminación fue de 50 a 70%. Es decir, se registró un aumento de 10 y 20% solo en los ápices en T10 y T12, con respecto a lo observado a los 14 días (Cuadro 3). Lo anterior significa que la gentamicina no ingresa en su totalidad en los ápices, o bien, ésta elimina algunas bacterias y disminuye la actividad de otras, las cuales se expresan al transcurrir el tiempo sin gentamicina.

A los 63 días, al incrementarse la contaminación, aumentó el porcentaje de oxidación y con ello disminuyó la supervivencia en la mayoría de los tratamientos. No obstante, se apreció que los ápices en los tratamientos T10 y T12 se manifestó 88 a 97% de oxidación, respectivamente; lo cual estuvo por encima de los porcentajes de contaminación de 60 y 70%, respectivamente. Lo anterior necesariamente afectó

la supervivencia, la cual se redujo a 30% en ambos tratamientos. Además, una proporción elevada de los ápices en estos tratamientos sufrió oxidación y mortalidad no asociada a la contaminación. Posiblemente la exposición a la gentamicina pudo causar algún tipo de toxicidad durante los primeros 14 días. Resultados diferentes fueron consignados por Niubó et al. (2004), quienes observaron que una concentración de 30 mg L⁻¹ de gentamicina aplicada por 14 días en vitroplantas de caña de azúcar, logró 92% de descontaminación de endófitos, el cual fue un tiempo de exposición mínimo que no ocasionó daños al tejido.

Por su parte el tratamiento T2 indujo el mayor porcentaje de ápices con brotes, así como el mayor promedio de brotes por explante; mientras que estuvo entre los tratamientos que propiciaron mayor grosor de tallo.

Por su parte, el agua de coco tuvo efecto significativo ($P < 0.05$) en diversas variables desde los primeros 14 días (Cuadro 2); toda vez que su adición al medio de cultivo aumentó la oxidación, disminuyó la supervivencia y hasta incrementó la fenolización desde la primera evaluación (datos no mostrados).

El tipo de regulador en el medio de cultivo tuvo efecto significativo sobre la contaminación ($P < 0.05$), durante los primeros 14 días en los tratamientos. Sin embargo, a los 63 días, cuando todos los tratamientos ya llevaban más de 40 días en el medio MS testigo, con 0.5 mg L⁻¹ de BAP, los efectos residuales de los reguladores continuaron afectando de forma significativa ($P < 0.05$) a la contaminación, supervivencia, EB, NBE y altura. Es decir, que los explantes de caña establecidos en el medio MS con BAP y AIA por los

primeros 14 días, mejoró la respuesta al cambiar los ápices al medio con solo BAP 0.5 (Cuadros 2 y 3). Al respecto, Rangel-Estrada et al. (2016), al utilizar las mismas concentraciones de reguladores propiciaron la mayor respuesta morfológica, aunque en su caso esto ocurrió en la etapa de multiplicación.

En todo caso, la desinfección con NaClO (3% 15 min) + (0.06% NaClO 5 min) y después cultivar en un medio sin agua de coco, pero con BAP+AIA por los primeros 14 y 63 d en medio líquido fue el mejor tratamiento.

Cuadro 3. Variables respuesta de explantes de ápice de caña de azúcar Var. MEX 69-290, después de su subcultivo a medio semisólido testigo MS+BAP0.2. Datos a los 63 dds o 49 dd del subcultivo a medio testigo sin gentamicina.

Tratamiento	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Supervivencia (%)	EB (%)	NBE	Altura (cm)	Grosor (mm)
1. D1/SAC/BAP	90 ab	90.2 a	10 bc	10 bc	0.3 b	2.0 a	3.3 ab
2. D1/SAC/BAP+AIA	50 c	60.0 b	50 a	50 a	1.5 a	1.8 ab	3.7 a
3. D1/CAC/BAP	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	1.9 ab	2.4 bcd
4. D1/CAC/BAP+AIA	90 ab	91.0 a	10 bc	10 bc	0.4 b	1.9 ab	2.3 cd
5. D2/SAC/BAP	90 ab	81.5 a	10 bc	10 bc	0.2 b	2.0 a	2.6 bcd
6. D2/SAC/BAP+AIA	90 ab	89.0 a	20 bc	20 bc	0.5 b	1.7 b	3.1 abc
7. D2/CAC/BAP	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	1.9 ab	2.4 bcd
8. D2/CAC/BAP+AIA	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	1.8 ab	1.9 d
9. D3/SAC/BAP	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	2.0 a	3.0 abc
10. D3/SAC/BAP+AIA	60 c	88.0 a	30 ab	20 bc	0.5 b	1.7 ab	3.9 a
11. D3/CAC/BAP	90 ab	99.0 a	10 bc	10 bc	0.2 b	1.9 ab	3.1 abc
12. D3/CAC/BAP+AIA	70 bc	97.0 a	30 ab	30 ab	0.5 b	1.6 b	3.3 ab
C.V.	9.97	9.73	12.98	NA	NA	16.5	37.89

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas (Tukey P<0.05).

D1. Método de desinfección 1=NaClO (3% 15 min) + (0.06% NaClO 5 min) o testigo. D2=NPsAg (0.005 mL L⁻¹) +NaClO (0.6% 3 min). D3= NaClO (3% 15 min) + Gentamicina (35 mg L⁻¹). SAC= Sin agua de coco y CAC= Con 15 % de agua de coco.

3.2. Optimización de la aclimatación

A los 23 d, todas las variables de estudio presentaron diferencias significativas (Tukey P<0.05) entre tratamientos (Cuadro 4). Las principales diferencias fueron entre los tratamientos T7 y T8, con respecto al resto de los tratamientos. Ambos indujeron el mayor porcentaje de supervivencia, número de hojas nuevas y promovieron la formación de raíces y su desarrollo, aunque también indujeron mayor cantidad de plántulas con hijuelos. Lo anterior implica que al tratar los brotes con AIB y micorriza

(T7) y la combinación de AIB, micorriza y epibrasinólida (T8), se mejora el enraizamiento y la aclimatación de plántulas de caña de azúcar. Sin embargo, el T8 propició hasta 75% de supervivencia; la cual estuvo positiva y significativamente correlacionada con el porcentaje de plantas con raíz (PR), número de raíces (NR), número de raíces secundarias (NRS), la longitud de la raíz principal (LRP) y la formación de hijuelos (NHij), con coeficientes de correlación de Spearman de r=0.71 a 0.90 (datos no mostrados).

Cuadro 4. Supervivencia y respuesta morfológica de brotes individuales de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* y sometidos a tratamientos para su enraizamiento y aclimatación simultánea *ex vitro*. Promedio de ocho repeticiones a los 23 dds.

Tratamiento	Supervivencia (%)	NHN	PR (%)	NR	NRS	LRP (cm)	NHij
1. Testigo	12.5 b	0.00 b	12.5 b	0.25 b	0.62 ab	0.25 b	0.00 b
2. Epi.	12.5 b	0.00 b	12.5 b	0.12 b	0.00 b	0.08 b	0.00 b
3. Micor.	12.5 b	0.12 b	12.5 b	0.12 b	0.37 b	0.87 b	0.12 b
4. Micor/Epi	12.5 b	0.12 b	12.5 b	0.25 b	0.87 ab	0.83 b	0.00 b
5. AIB	0.0 b	0.00 b	12.5 b	0.25 b	0.00 b	0.08 b	0.00 b
6. AIB/Epi	12.5 b	0.12 b	12.5 b	0.62 b	0.00 b	0.43 b	0.12 b
7. AIB/Micor.	37.5 a	1.00 a	37.5 ab	2.25 ab	2.62 ab	2.47 ab	0.25 ab
8. AIB/Micor/Epi	75.0 a	1.75 a	75.5 a	4.87 a	3.75 a	4.06 a	1.0 a
C.V.	14.1	21.3	15.4	13.9	15.3	21.3	17.6

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras distintas por columna, son estadísticamente diferentes (Tukey P<0.05). El grupo estadístico corresponde a datos previamente transformados con $\sqrt{x + 1}$.

NHN= Número de hojas nuevas, PR= Porcentaje de plantas con raíz, NR= Número de raíces, NRS= Número de raíces secundarias, LRP= Longitud de raíz principal, NHij= Número de hijuelos por planta.

El análisis factorial demostró que, someter los brotes a la solución de 10 mg L⁻¹ de AIB favoreció significativamente la supervivencia (P<0.05), emisión de hojas y sobre todo la

formación de nuevas raíces y el crecimiento de éstas; así como la emisión de pequeños hijuelos (Cuadro 5). De igual forma, cuando se incorporó la micorriza al hoyo de siembra,

ésta favoreció la respuesta en la mayoría de las variables; dicha diferencia fue significativa ($P < 0.05$) con respecto a la ausencia de la micorriza. Por su parte, la aplicación de la epibrasinólida no indujo diferencias significativas ($P > 0.05$), aunque los valores para todas las variables fueron siempre mayores cuando ésta fue aplicada (Cuadro 5). Los resultados anteriores demuestran que el AIB es una auxina que mejora la inducción de raíces en brotes de caña y que la rizogénesis es potenciada, cuando la auxina interactúa con la micorriza

R. irregularis. Si bien la aplicación de la epibrasinólida, en la mayor parte de los tratamientos y en el análisis factorial, no tuvo efectos significativos ($P > 0.05$), este fitorregulador fue determinante para la supervivencia y desarrollo de plantas completas al interactuar el AIB y la micorriza. Los resultados en esta investigación coinciden con lo reportado para banano por Cruz et al. (2012), quienes obtuvieron más del 90% de plantas aclimatadas con la aplicación de auxina y micorriza.

Cuadro 5. Supervivencia y respuesta morfológica de brotes individuales de caña (*Saccharum* spp.) provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* en función de los efectos de los diferentes factores de estudio para el enraizamiento y aclimatación *ex vitro*. Promedio de 32 repeticiones a los 23 dds.

Factor y niveles	Supervivencia (%)	NHN	PR (%)	NR	NRS	LRP (cm)	NHij
AIB							
Sin	12.5 b	0.06 b	12.5 b	0.18 b	0.46 b	0.53 b	0.03 b
10 mg L ⁻¹ .	31.2 a	0.71 a	40.6 a	2.00 a	1.59 a	1.76 a	0.34 a
Micorriza							
Sin	9.37 b	0.03 b	18.75 a	0.31 b	0.15 b	0.21 b	0.03 b
1.5 g	34.37 a	0.75 a	34.38 a	1.87 a	1.90 a	2.08 a	0.34 a
Epibrasinólida							
Sin	15.62 a	0.28 a	18.75 a	0.71 a	0.90 a	0.92 a	0.09 a
0.0096 mg L ⁻¹	28.12 a	0.50 a	34.38 a	1.46 a	1.15 a	1.38 a	0.28 a
C.V.	14.1	21.3	15.4	13.9	15.3	21.3	17.6

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras distintas por columna y factor, son estadísticamente diferentes (Tukey $P < 0.05$). El grupo estadístico corresponde a datos previamente transformados con $\sqrt{x + 1}$.
 NHN= Número de hojas nuevas, PR= Porcentaje de plantas con raíz, NR= Número de raíces, NRS= Número de raíces secundarias, LRP= Longitud de raíz principal, NHij= Número de hijuelos por planta.

4. Conclusión

En la etapa de desinfección de ápices de caña de azúcar, la adición de gentamicina al medio de cultivo mejoró los porcentajes de desinfección solo durante los primeros 14 días. La variabilidad de respuesta en la contaminación asociada al método de desinfección estuvo relacionada con la presencia de bacterias endófitas. No obstante, el único tratamiento con los mayores niveles de asepsia, supervivencia y respuesta morfológica por 14 y 63 días correspondió al tratamiento con NaClO al 3% por 15 min+ NaClO al 0.06% por 5 min y con BAP+AIA en el medio de cultivo. De igual forma fue posible la aclimatación del 75% de los brotes de caña de azúcar sin raíces, provenientes directamente de la etapa de multiplicación, mediante la adición a la base de los brotes la auxina AIB, 1.5 g de micorriza al hoyo de siembra y dos aplicaciones en hojas de 1 mL de 0.0096 mg L⁻¹ de la epibrasinólida.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Ing. Jorge Aurelio Chávez Zaragoza, del Grupo Porres, por otorgar los permisos y proporcionar el apoyo técnico para la donación y recolecta del material genético en el Campo Experimental del Ingenio de Huixtla.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Abad M. 1989. Los sustratos en horticultura ornamental. Revista Agrícola Vergel 3: 146-152.
- Agramonte PD, Jiménez TF, Rodríguez MAD. 1998. Aclimatación. En: Pérez Ponce JN (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Pp. 193-206.
- Alvarado-Capó Y, Portal-González N, García-Aguila L, Ramírez D, Gutiérrez Y. 2003. Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar. Biotecnología Vegetal 3(1): 31-36.
- Caamal VJH, Bello BJJ. 2014. Manual de micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Colegio de Postgraduados-Fundación Produce Campeche, México. 23 p.
- Chávez-García JA, Andrade-Rodríguez M, Bello-Bello JJ, Rueda-Barrientos MC, Guillén-Sánchez D, Sainz-Aispuro MJ. 2020. Nanopartículas de plata en el establecimiento *in vitro* de ápices de gladiolo. Revista Fitotecnia Mexicana 43: 557-564.
- Cruz CCI, Iracheta DL, Sandoval CG, Méndez LI, López GP, Castellanos JM. 2012. Respuesta de vitroplantas de banano al tratamiento con brasinoesteroide y biofertilizantes durante la aclimatación. XXIV Congreso Nacional y IV Internacional de Fitogenética. Pp. 226.
- Del Castillo YV, Iracheta DL, Aguirre MJF, Ovando MI, Castellanos JM, López GP, Méndez LI. 2010. Transformación de embriones somáticos de *Coffea canephora* P. a plantas por aplicación de brasinoesteroides,

- adenina y sustratos de siembra. Memorias del XXXIII Congreso Nacional y III Internacional de Fitogenética. Pp. 1.
- Díaz E, Perera M, Paz N, Rocco P, Ovejero N, Serviño A, Castagnaro A, Noguera A. 2020. Proceso de producción de vitroplantas de caña de azúcar de pureza genética y sanidad garantizadas en etapa de laboratorio en la EEAOC. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán. 97(2): 39-44.
- Díaz, LP, Medina LF, Latife J, Dignonzelli PA, Sosa SB. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias 33: 115-128.
- García D, Serrano H. 2020. La caña *Saccharum officinarum* ¡azúcar! Revista Tecno Agro 144.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Niubó E, Díaz P, Oliva O, Portieles R, Díaz A, Ancheta O, Rodríguez S, Soto A, Sánchez C. 2004. Metodología para la obtención *in vitro* de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. Revista CENIC Ciencias Biológicas 35: 155-161.
- Pineda RE, Acosta HF, Fernández DI, Núñez JD, Hernández FAR, Aday DOC, Occeguera ÁZ, Machado AP, Jiménez VM, Toledo RE, Más MR. 2018. Nuevo sustrato para la aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar. Centro Agrícola 45: 32-36.
- Preece JE, Sutter EG. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. En: Debergh PC, Zimmerman RH. (eds). Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic. Dordrecht, Pp. 71-93.
- Rangel-Estrada SE, Hernández-Meneses E, Hernández-Arenas M. 2016. Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. Revista Fitotecnia Mexicana 39: 225-231.
- SIAP. 2024. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2023. Recuperado de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta: 27 de junio 2024.