



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Trabajo de Graduación

Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) del cultivar CCO6-791

AUTOR

Br. Jackson Enmanuel Navarro González

ASESORES

Ing. MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Ing. Harlem Tania Ríos Peralta

Managua, Nicaragua

Marzo, 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Trabajo de Graduación

Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) del cultivar CCO6-791

AUTOR

Br. Jackson Enmanuel Navarro González

ASESORES

Ing. MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Ing. Harlem Tania Ríos Peralta

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador, como requisito final para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua

Marzo, 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la decanatura de la Facultad de Agronomía (FAGRO) de la Universidad Nacional Agraria (UNA) como requisito final para optar al grado de:

Ingeniero Agrónomo

MIEMBROS DEL HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

MSc. Martha Gutiérrez

Presidenta

Ing. Roxana Cruz Cardona

Secretaria

MSc. Aleyda Lopez

Vocal

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. General	3
2.2. Específicos	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. Localización del experimento	5
3.2. Descripción del cultivar CC06-791	4
3.3. Esterilización de materiales y equipos	4
3.4. Fase de multiplicación	4
3.4.1. Definición del mejor medio de cultivo en fase de multiplicación	5
3.4.1.1. Variable a evaluar y análisis estadístico	6
3.4.2. Número de plantas por BEIT	6
3.4.2.1. Variable a evaluar y diseño estadístico	7
3.5. Fase de enraizamiento	7
3.5.1. Variable a evaluar y diseño estadístico	7
3.6. Fase de aclimatación	8
3.6.1. Variable a evaluar y diseño estadístico	8

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Fase de multiplicación	11
4.2. Número de plantas por BEIT	13
4.3. Fase de enraizamiento	14
4.4. Fase de aclimatación	17
V. CONCLUSIONES	20
VI. RECOMENDACIONES	21
VII. LITERATURA CITADA	22

DEDICATORIA

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi madre Juana Francisca González por ser el pilar fundamental y a quien le debo todo en la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindó para culminar mi carrera profesional en todo lo que soy, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Gracias a Dios por permitirme tener una familia que siempre creyó en mí y gracias a mi familia por ser la motivación para cada día llegar más lejos en mi vida este trabajo es el fruto de personas extraordinarias para mí, que me animaron y estuvieron conmigo, en los diferentes momentos de mi vida. Son seres que irradian el amor que me tienen, lo cual me motiva siempre a seguir.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Br. Jackson Enmanuel Navarro González

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes experiencias y sobre todo felicidad.

Mis maestros. Gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional, en especial: al Ing. MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga, Ing. Harlem Tania Ríos Peralta e Ing. Roxana Cruz Cardona por haber guiado en el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.

A todo el personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos *in vitro* de la UNA, por su tiempo y ayuda en la realización del estudio, entregarme conocimiento ganado gracias a su experiencia por tanto tiempo y tener ánimo y positivismo ejemplares, entregando un grato ambiente en dicho laboratorio.

A mis amigos y trabajadores, con quienes he compartido una amistad por tantos años en mi estadía en la UNA en especial a Miriam Rodríguez, Anielka Vanega, Dñ. Lorena López, Iliria Saucedo, Angélica Meza, Adriana Ayola, Milton Alvarado, Luis Martínez, Dennis Martínez y Ballardo Benitez por compartir cada momento inolvidable a su lado a lo largo de la carrera, por seguir disfrutando de nuestra amistad. Son personas incondicionales a las que hoy en día considero parte de mi familia.

¡Gracias a todos ustedes...!

Br. Jackson Enmanuel Navarro González

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Variante del medio de cultivos en la fase de multiplicación del cultivar de caña de azúcar CC06-791.	6
2.	Variantes de medios de cultivo en fase de enraizamiento.	7
3.	Frecuencia de aplicación de bioestimulantes en fase de aclimatación de plantas <i>In vitro</i> de caña de azúcar CC06-791.	8
4.	Efecto del BAP en longitud de planta; número de hojas, número de brotes y número de raíces del cultivar caña de azúcar CC06-791 a las tres semanas.	12
5.	Efecto del número de plantas por BEIT en las variables longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y número de raíces.	14
6.	Efecto del AIA en longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y número de raíces del cultivar caña de azúcar CC06-791 en fase de enraizamiento a las tres semanas.	15
7.	Fertilización con biofertilizantes PROTIFER LMW en fase de aclimatación del cultivar CC06-791 a los 0, 7, 14, 21, 35 días.	17
8.	Fertilización con biofertilizantes MILAGRO PROMET en fase de aclimatación del cultivar CC06-791 a los 0, 7, 14, 21, 35 días.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Plantas separadas de forma individual para la siembra en BEIT en la fase de multiplicación.	5
2.	Determinación del volumen de raíces del cultivar de caña de azúcar CC06-791.	9
3.	Experimento en bloque completamente al azar en fase de aclimatación del cultivar de caña de azúcar CC06-791.	10
4.	Izquierda: BEIT de 1000 ml con plantas de caña de azúcar cultivar CC06-791 en la fase de multiplicación. Derecha: Brotación axilar a las tres semanas.	13
5.	Planta caña de azúcar cultivar CC06-791 en fase de enraizamiento a las tres semanas.	16
6.	Efecto de la fertilización con PROTIFERT LMW y MILAGRO PROMET en la Supervivencia de plantas de caña de azúcar cultivar CC-06791 aclimatadas a las siete semanas	19
7.	Planta caña de azúcar cultivar CC06-791 en la fase de aclimatación a las seis semanas.	20

RESUMEN

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA) localizada en el Km 12.5 carretera panamericana norte Managua, Nicaragua, en el período comprendido entre los meses de noviembre del año 2017 y mayo del 2018. En el mismo se realizaron los experimentos en las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de plantas *in vitro* de caña de azúcar del cultivar CCO6-791. Para los estudios de las fases *in vitro*, se emplearon Biorreactores Económicos de inmersión Temporal (BEIT) con capacidad de 1000 ml. Se utilizó un diseño experimental bloque completamente al azar y comparación de medias de acuerdo a Duncan ($p \leq 0.05$). En la fase de multiplicación se adiciono a los medios de cultivo concentraciones de BAP de 3 ó 4 mg/l⁻¹. La siembra entre 50 y 60 plantas favorecieron la formación de mayores promedios de brotes axilares. El objetivo es la comercialización masiva de plantas *in vitro*, es posible sembrar 70 plantas por BEIT. Adiciones de 0.75 y 1 mg/l⁻¹ de AIA a los medios de cultivo incrementaron el número de raíces por planta lográndose medias respectivas de 20 y 20.67. En fase de aclimatación aplicaciones de los biofertilizantes PROTIFERT LMW y MILAGRO PROMET con el tratamiento 5 favorecieron una mejor respuesta estadística de las variables longitud de plantas y volumen de raíces. El mayor promedio de supervivencia (88.3%) se obtuvo cuando se aplicó el tratamiento 1 del producto PROTIFERLMW. En el tratamiento 3 del producto MILAGRO PROMET se logró mayor porcentaje de supervivencia (85%).

Palabras Claves: *Saccharum officinarum* L, Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal, medios de cultivo, biofertilizantes

ABSTRACT

The study was conducted in the tissue culture laboratory of the National Agrarian University (UNA) located at Km 12.5 Pan-American Highway north of Managua, Nicaragua, in the period between November 2017 and May 2018. The experiments were carried out in the multiplication, rooting and acclimatization phases of *in vitro* plants of sugarcane of the cultivar CCO6-791. For studies of the *in vitro* phases, Temporary Immersion Economic Bioreactors (BEIT) with a capacity of 1000 ml were used. We used a completely randomized block experimental design and comparison of means according to Duncan ($p \leq 0.05$). In the multiplication phase, BAP concentrations of 3 or 4 mg / l⁻¹ can be added to the culture media. The sowing between 50 and 60 plants favored the formation of higher averages of axillary shoots. The objective is the massive commercialization of plants *in vitro*, it is possible to plant 70 plants by BEIT. Additions of 0.75 and 1 mg / l⁻¹ of AIA to the culture media increased the number of roots per plant, achieving respective means of 20 and 20.67. In the acclimatization phase, applications of the biofertilizers PROTIFERT LMW and MILAGRO PROMET with treatment 5 favored a better statistical response of the variables plant length and root volume. The highest average survival (88.3%) was obtained when treatment 1 of the PROTIFERLMW product was applied. In treatment 3 of the MILAGRO PROMET product, a higher percentage of survival was achieved (85%).

Key words: *Saccharum officinarum* L, Economic Immersion Temporary Bioreactors, culture media, biofertilizers

I. INTRODUCCIÓN

El género (*saccharum tribu*) Andropogoneae de la familia Gramínea. El género (*Saccharum*) tiene sólo cinco especies, cuatro de ella silvestres y una cultivada, (*Saccharum officinarum L.*); (Pérez, 1991). (*Saccharum barber*) (Jerw), (*Saccharum spontaneum*) es una especie muy polimorfa desde el punto de vista citológico, sistemático y ecológico. Tiene buena resistencia a muchas enfermedades y ha donado este carácter a muchas cultivares comerciales; (*Saccharum sinensis*) (Roxb y Jaswiet) ocurre en estado silvestre y también como especie cultivable, es muy estable genéticamente. (*Saccharum officinarum L.*), citológicamente es muy heterogénea y ha dado origen por cruzamiento a las cultivares comerciales (Hernández y Rugama, 1998).

La teoría actual más comúnmente admitida, señala que (*Saccharum robustum*), es la especie ancestral de (*Saccharum officinarum L.*) su lugar de origen es Nueva Guinea (Fauconnier y Basse Reau, 1975). La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea tropical perenne con tallos gruesos y fibrosos que pueden llegar a medir de 3 hasta 5 metros de altura con 5 ó 6 cm de grosor, se desarrolla mejor en suelos francos, profundos y bien drenados, aunque se puede cultivar en cualquier tipo de suelo con pH de 5.5 a 7.8 siendo 7 el valor óptimo. El clima ideal son zonas calientes con abundante luz solar ya que es muy eficiente en el aprovechamiento de ésta, el rango de temperatura varía entre 16 a 30°C, con alturas de 0 a 1000 msnm y una precipitación mínima de 1500 mm de lluvia por temporada (Ramírez, 2008).

La caña de azúcar tiene un elevado contenido de sacarosa por lo cual es de gran interés para el sector agrícola. Además, se puede obtener materia prima para varios derivados, algunos de estos destinados a la alimentación animal y adicionalmente aporta a la economía de muchos países tropicales. Es el cultivo con mayor eficiencia al momento de captar energía solar para luego almacenarla y convertirla de biomasa a fibra y azúcares fermentados (FAO, 1988).

El cultivo de caña de azúcar en Nicaragua es uno de los principales productos de exportación. En la zafra 2017-2018 en nuestro país el área de producción fue de 155,714.28 ha⁻¹ en los cuatro ingenios (El nuevo diario, 2017).

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Hartmann y Kester, 1997).

La micropropagación en caña de azúcar se ha convertido en una metodología muy usada e importante para el mejoramiento del cultivo, además pretende maximizar la producción de plántulas utilizando menor espacio para una producción masiva, con el principal propósito de obtener plantas sanas, vigorosas y libres de patógenos. (Naik, 2001).

Las principales limitantes de los protocolos de micropropagación convencional son los bajos coeficientes o tasas de multiplicación, el alto costo de la mano de obra y una escasa posibilidad de automatización (Teisson, and Alvard, 1994).

Los biorreactores brindan la posibilidad de automatizar el proceso de propagación *in vitro* de la gran mayoría de las especies (Ettienne y Berthouly, 2002). Además, solucionan las dificultades de los medios de cultivo líquidos estáticos (en frascos con agar) al facilitar la manipulación del ambiente *in vitro*, lo que permite controlar parámetros de cultivos y favorece el crecimiento e incrementa la eficiencia biológica del material vegetal (Escalona *et al.*, 2006).

Entre los tipos de biorreactores, los de inmersión temporal se diseñaron basándose en el uso de medios de cultivo líquido y la automatización del proceso de micropropagación con la finalidad de aumentar las tasas de multiplicación de especies vegetales de interés agrícola, forestal y medicinal; de esta manera se obtiene un mayor número de plantas por recipiente, el reemplazo del medio de cultivo es sencillo y demanda poca mano de obra (Albarrán y Salazar *et al* 2014).

El empleo de los Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) desarrollado en la Universidad Nacional Agraria (UNA) en el laboratorio de cultivo de tejidos para la producción masiva de plantas *in vitro* tiene las ventajas de evitar la inmersión continua del material vegetal en el medio del cultivo, proveen adecuada transferencia de oxígeno, bajos costos de adquisición, se pueden armar fácilmente, se reduce el tiempo y su costo de producción, favoreciendo la mejora de la calidad genética y fitosanitaria de cultivos como plátano, caña de azúcar, teca, etc. (Aguilar, 2014).

II. OBJETIVOS

General:

Definir medios de cultivo en las fases de multiplicación y enraizamiento, así como el número de tejidos por biorreactor y la fertilización de plantas *in vitro* del cultivar de Caña de azúcar CCO6-791.

Específicos:

Determinar la mejor concentración de los reguladores de crecimiento en las fases de multiplicación y enraizamiento en BEIT.

Definir el número de plantas por BEIT que favorece el incremento del coeficiente de multiplicación.

Definir la frecuencia de fertilización que favorece el crecimiento y la supervivencia en la fase de aclimatación de plantas *in vitro* del cultivar de caña de azúcar CC06-791.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del experimento

El ensayo se estableció en el laboratorio de cultivo de tejido vegetal de la Facultad de Agronomía, ubicado en el km 12½ carretera Norte, UNA-Managua. El estudio se realizó en el período comprendido entre el mes de diciembre del año 2017 y el mes de mayo del año 2018.

El Material genético utilizado fue facilitado por la Compañía Azucarera del Sur, S.A. (CASUR) que introdujo plantas *in vitro* de la cultivar CCO6-791 provenientes del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA).

3.2. Descripción del cultivar CCO6-791

El cultivar CCO6-791 tiene alta capacidad de macollamiento y posee follaje abundante de un color verde oscuro cuyas láminas son decumbentes que permiten cierre de calles. El hábito de crecimiento del cultivar es ligeramente inclinado y no presenta ningún tipo de deshoje natural. La floración es considerada escasa y se tiene que sembrar antes del mes de marzo, después de esta fecha aún en la zona alta de la zona cañera de Rivas (>83 msnm) para alcanzar el grado de madurez el entrenudo es curvado ligeramente en zig-zag con abundante cera tanto en la banda cerosa como a lo largo del entrenudo. El nudo tiene forma ligeramente de un cono y el anillo de crecimiento semi-ancho y presenta protuberancia intermedia (Compañía Azucarera del Sur CASUR. 2017).

3.3. Esterilización de materiales y equipos

Para el lavado de los BEIT se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO_3) al 1% sumergidos 24 horas, posteriormente se eliminaron los residuos de cloro con agua del grifo y se dejaron escurrir durante 30 min. Previo a la siembra de los tejidos *in vitro*, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C a 1.0 atmósfera de presión por 20 minutos. Los platos petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en el horno a temperaturas de 180°C durante 1 hora. Previo a la siembra de los tejidos se procedió a desinfectar el área de trabajo de la cámara de flujo laminar, con NaClO_3 al 1%, posteriormente se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

3.4. Fase de multiplicación

3.4.1. Definición del mejor medio de cultivo en fase de multiplicación

Se realizó un experimento en BEIT con capacidad de 1000 ml para definir las mejores variantes del medio de cultivo que generen plantas de mayor calidad en cuanto a la expresión de las variables morfológicas (longitud de planta, número de hojas, número de brotes axilares y número de raíces). Se sembraron 20 plantas individuales en cada BEIT que contenía 60 ml de medio de cultivo líquido. Con ayuda de escalpelos y sobre platos de aluminio estériles se separaron plantas y a cada una de ellas se les cortaron una parte del extremo apical de las hojas obteniéndose plantas de 3 a 5 cm de longitud como se aprecia en la figura 1. Una vez finalizada la siembra de las plantas en los BEIT, fueron llevados al cuarto de crecimiento para conectarlos de forma individual a una manguera y ésta a la tubería por donde circula el suministro de aire que se inyecta por medio de una bomba de vacío.

Las plantas contenidas en los BEIT permanecieron durante tres semanas en condiciones ambientales de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas en oscuridad y una intensidad de 2000 lux. Se suministraron dos riegos de inmersión al día, cada uno con duración de tres minutos.



Figura 1. Plantas separadas de forma individual para la siembra en BEIT en la fase de multiplicación.

Las variantes de medios de cultivo en la fase de multiplicación se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Variantes del medio de cultivo en la fase de multiplicación del cultivar de caña de azúcar CCO6-791

Variantes del medio MS (1962)	Concentración de *BAP (mg l ⁻¹)
1	0.0
2	0.1
3	0.2
4	0.3
5	0.4

* Bencil amino purina; MS= Murashige y Skoog.

3.4.1.1. Variables a evaluar y análisis estadístico

Para determinar el mejor tratamiento se evaluaron las siguientes variables:

- a. Longitud de planta en cm
- b. Número de hojas
- c. Número de brotes axilares mayores de 0.5 cm
- d. Número de raíces

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por 3 repeticiones (BEIT) y un total de 15 BEIT en los 5 tratamientos. Cada unidad experimental se conformó con 25 plantas individuales por variante de medio de cultivo en cada BEIT. A los datos obtenidos se les practicó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar el grado de significación entre las medias se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p \leq 0.05$. Los datos se procesaron y analizaron en el programa estadístico de Software INFOSTAT versión 2015.

3.4.2. Número de plantas por BEIT

Se agregaron las cantidades de 50, 60 y 70 plantas por BEIT para determinar el efecto en la brotación axilar, el número de hojas, longitud de planta y número de raíces. En cada BEIT con volumen de 1000 ml se agregó la cantidad de 210 ml de medio de cultivo.

3.4.2.1. Variables a evaluar y diseño estadístico

A las tres semanas de establecido el experimento se evaluaron las siguientes variables.

- a. Longitud de planta en cm
- b. Número de hojas por planta
- c. Número de brotes por planta mayores de 0.5 cm
- d. Número de raíces

Para definir el mejor número de plantas por BEIT se empleó el diseño estadístico BCA, además se realizó el análisis de ANDEVA y para determinar el grado de significación entre las medias se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p \leq 0.05$. Los datos se procesaron y analizaron en el programa estadístico de software INFOSTAT versión 2015.

3.5. Fase de enraizamiento

En la fase de enraizamiento se sembraron 60 plantas por BEIT con capacidad de 1000 ml y se agregaron a cada uno 210 ml medio de cultivo. En el cuadro 2 se presentan las variantes de medio de cultivo estudiadas.

Cuadro 2. Variante de medio de cultivo en fase de enraizamiento

Variantes del medio MS (1962)	Concentración de *AIA (mg l ⁻¹)
1	0.00
2	0.25
3	0.50
4	0.75
5	1.00

3.5.1. Variables a evaluar y diseño estadístico

La evaluación se realizó a las tres semanas tomando en cuenta las variables descritas en el acápite 3.4.1.1.

En el experimento se estableció en un diseño de bloque completo al azar (BCA) con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por tres BEIT conteniendo cada uno 60 plantas. Los datos obtenidos en las variables evaluadas se les realizó un ANDEVA y para determinar las diferencias entre las medias se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p \leq 0.05$.

Los datos se procesaron y analizaron en el programa estadístico de software INFOSTAT versión 2015.

3.6. Fase de aclimatación

Se evaluó en la fase de aclimatación el efecto de dos productos biofertilizantes estimulantes de crecimiento en plantas. Las parcelas se conformaron con plantas *in vitro* debidamente enraizadas y de buen vigor que se sembraron en bolsas de polietileno de 4x4 cm conteniendo como sustrato abono orgánico compost. Los productos que se aplicaron fueron el fertilizante bioestimulante orgánico PROTIFERT LMW y el bioactivador del crecimiento MILAGRO PROMET 32SL. Los productos se aplicaron asperjados sobre las plantas con una bomba de mochila a razón de 3 ml por litro de agua y una frecuencia de aplicación ente 0 a 5 aspersiones en un período de 35 días. Se definió un número de 30 plantas por tratamiento. Los tratamientos se realizaron de la siguiente manera: El tratamiento testigo (0) solo se regó con agua; el tratamiento 1 se fertilizó solo una vez a los 7 días; el tratamiento 2 se fertilizó a los 7 y a los 14 días; el tratamiento 3 se realizó a los 7, 14 y 21 días; el tratamiento 4 a los 7, 14, 21 y 28 días y el tratamiento 5 a los 7, 14, 21, 28 y 35 días (Cuadro 3.)

Cuadro 3. Frecuencia de aplicación por producto PROTIFERT LMW o MILAGRO PROMET en la fase de aclimatación de plantas *in vitro* de caña de azúcar CC-06791

Tratamientos	Frecuencia de aplicación de productos PROTIFERT LMW y MILAGRO PROMET
Testigo (0)	Solamente agua durante los 35 días
1	Fertilizantes a los 7 días
2	Fertilizantes a los 7 y 14 días
3	Fertilizantes a los 7, 14 y 21 días
4	Fertilizantes a los 7,14,21y 28 días
5	Fertilizantes a los 7,14,21,28 y 35 días

3.6.1. Variables a evaluar y diseño estadístico

La evaluación del efecto de los dos productos biofertilizantes se realizó a los 42 días después de la siembra. Se evaluaron las siguientes variables:

- a. Longitud por plantas en cm
- b. Número de hojas
- c. Número de brotes axilares mayores de 0.5 cm
- d. Volumen de raíces (cm³)

El volumen de raíces por planta se determinó de acuerdo a la metodología reportada por y Gil y Díaz (2016) basada en el principio de Arquímedes de desplazamiento de volumen en (cm³). Previo a la medida de volumen de raíces por planta, previamente en una probeta con capacidad de volumen de 500 cc o ml se procedió a llenar con 90 ml de agua. Una vez introducidas las raíces emitidas por cada planta evaluada, se procedió a determinar la diferencia entre el volumen de agua desplazado por las raíces y los 90 ml de agua agregados inicialmente en la probeta.

Figura 2



Figura 2. Determinación del volumen de raíces del cultivar de caña de azúcar CC-06791.

El experimento se estableció un diseño de bloque al azar (BCA) definiéndose una cantidad de 30 plantas por tratamiento y 180 plantas por producto aplicado. En total 360 plantas se evaluaron en los dos productos biofertilizantes ver (figura 3).

El análisis estadístico, la definición del mejor tratamiento y programa estadístico empleado fue similar al empleado en el acápite 3.4.1.1



Figura 3. Experimento en bloques completos al azar en fase de aclimatación del cultivar de caña de azúcar CC-06791.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de Multiplicación

La micropropagación convencional además de ser una tecnología de alto costo, requiere de transferencias periódicas del material plantado a un medio fresco, después de 4-6 semanas, debido al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo y por el continuo crecimiento y proliferación de los cultivos, la cual es rápidamente limitada por el tamaño de los contenedores de cultivo (Meane y Debergh, 1985) citados por (Etienne y Berthouly, 2002).

Las ventajas de los sistemas de inmersión temporal sobre la micropropagación convencional parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como son: aporte más eficiente de los elementos nutritivos, mínima interrupción del intercambio de gases entre el explante o embrión y la atmósfera, no hay acumulación excesiva de gases nocivos para los tejidos y la dispersión de los tejidos por efecto del flujo de aire en recipiente. (Pérez *et al.*, 1998).

No se registraron diferencias estadísticas por efecto de los diferentes tratamientos en las variables longitud de planta y número de hojas por planta como se observa en el cuadro 4.

La media del número de brotes por planta con la adición de 0.40 mg/l^{-1} BAP fue de 10.47 superior estadísticamente a los obtenidos tanto en el tratamiento testigo como en el medio que se le adicionó 0.10 mg/l^{-1} BAP con medias respectivas de 8.91 y 9.56 brotes. Con 0.40 mg/l^{-1} BAP se observó similar comportamiento estadístico en número de brotes con las variantes de medios de cultivo que se les agregaron concentraciones 0.20 y 0.30 mg/l^{-1} de BAP.

No hubo diferencias significativas entre las medias de número de raíces emitidas cuando se adicionaron dosis de BAP. Únicamente se presentaron diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento testigo y el tratamiento que contenía 0.40 mg/l^{-1} de BAP como se observa en el cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto del BAP en longitud de planta, número de hojas, número de brotes y número de raíces del cultivar caña de azúcar CC-06791 a las tres semanas.

Regulador de crecimiento mg/l ⁻¹ de BAP	Longitud de la planta en cm	Número de hojas	Números de brotes	Número de raíces
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
0.00	8.55 ± 0.84a	5.40 ± 0.17a	8.91 ± 0.19c	5.13 ± 0.46b
0.10	10.61 ± 0.19a	5.62 ± 0.19a	9.56 ± 0.33bc	8.09 ± 1.58ab
0.20	8.65 ± 0.87a	5.71 ± 0.23a	9.84 ± 0.29ab	7.33 ± 0.38ab
0.30	10.32 ± 1.36a	5.73 ± 0.20a	10.18 ± 0.30ab	8.64 ± 1.32a
0.40	9.69 ± 0.69a	5.27 ± 0.18a	10.47 ± 0.24a	8.93 ± 0.56 a

Medias con letras desiguales en una columna difieren según la prueba de Duncan para $p \leq 0.05$

Considerando lo señalado por Hernández y Rugama, (1998) que citológicamente la caña de azúcar es muy heterogénea, es prudente en la micropropagación adicionar concentraciones de BAP que contribuyan a que las plantas conserven un alto grado de estabilidad genética. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, recomendamos la adición de 0.30 mg/l⁻¹ porque que además de lograrse un buen coeficiente de multiplicación de 10.18 brotes axilares, la expresión de las variables longitud de plantas, número de hojas y número de raíces es aceptable. Sí se cuenta con una cantidad de 20 BEIT de 1000 ml y sembramos 50 explantes por recipiente y considerando el coeficiente de brotación axilar o de multiplicación de 10.18 brotes axilares, en tres semanas se puede estimar una producción potencial de 10, 180 plantas.

Los resultados en brotación axilar obtenidos en los BEIT con el cultivar CC-06791 fue superior al promedio de brotación reportada en micropropagación estacionaria por (Rangel y Hernández *et al.* 2016) en el cultivar ITV 92-1424 la cantidad de brotes axilares (6.9) obtenidas con 1.7 mg l⁻¹ de BA, mientras que en el cultivar Laica 82-2220 produjo 7.8 brotes con 1.13 mg l⁻¹ de BA. Aunque en el cultivar Q28-2 lograron mayor promedio de formación de brotes 25.8 con adición al medio de 0.56 mg l⁻¹ de BA, que significa más del doble de la cantidad obtenida en los otros dos cultivares. Con respecto al tamaño de los brotes logrados por (Rangel y Hernández *et al.* 2016), éstos alcanzaron en promedio inferior (5.6 cm) en los tres cultivares en comparación a los promedios alcanzados en el cultivar CC-06791. Al ser diferente la respuesta para cada genotipo, sus requerimientos hormonales, nutricionales y las condiciones de cultivo

(temperatura, luz, etc.) van a variar, por tanto es necesario establecer las condiciones específicas para cada genotipo, así como la forma de su manejo *in vitro* con vistas a lograr tasas de multiplicación razonables (Jiménez y Pérez *et al.* 1999). Castro y Maradiaga (2015), mencionan que Murashige, (1974) y Hu y Wang, (1983) enfatizan que en la fase de multiplicación tiene especial importancia la relación citoquinina/ auxina, que varía dependiendo del método de multiplicación elegido. Para la inducción de brotes axilares se recomiendan concentraciones moderadas de ambas hormonas, sin embargo, para el desarrollo de yemas axilares son necesarias altas concentraciones de citoquininas, añadiéndose a menudo bajas dosis de auxina, que aunque no mejoren las tasas de multiplicación, si mejoran el crecimiento de los brotes.

En la figura 4 se presentan plantas micropropagadas en el BEIT de 1000 ml y plantas con brotación axilar de yemas. Una ventaja del sistema BEIT en comparación a otros modelos de biorreactores que se emplean en diferentes laboratorios de América Latina, es la disminución de los gastos de inversión y electricidad gracias a que en su funcionamiento se hace uso de un solo recipiente que contiene los tejidos y el medio de cultivo.

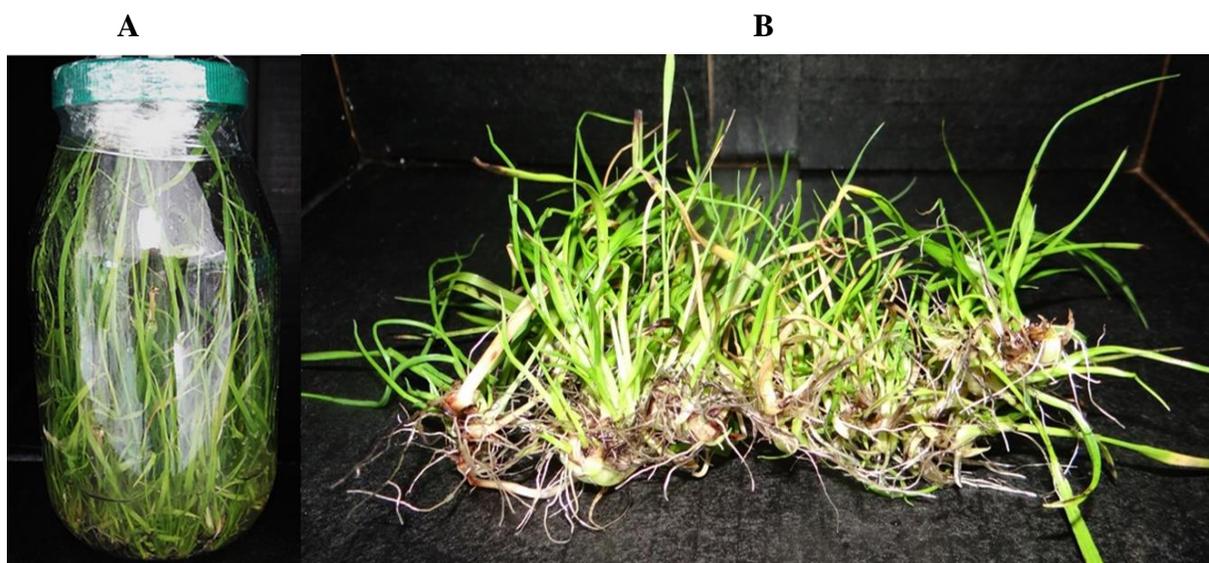


Figura 4. (A) BEIT de 1000 ml con plantas de caña de azúcar cultivar CC-06791 en fase de multiplicación. (B) Brotación axilar a las tres semanas.

4.2. Número de plantas por BEIT

Entre las variables longitud de planta, número de hojas y número de raíces no se registraron diferencias estadísticas cuando se sembraron cantidades de 50, 60 y 70 plantas por BEIT.

Únicamente en número de brotes se presentaron diferencias significativas con mejores resultados cuando se sembraron 50 plantas por BEIT en comparación con la siembra de 70 tejidos, resultando medias respectivas de 9.84 y 8.76 brotes axilares por planta. No se observó en esta misma variable diferencias estadísticas entre las medias obtenidas con siembras de 60 y 70 plantas por BEIT.

De acuerdo a la perspectiva económica con el funcionamiento de un proyecto de producción a gran escala haciendo uso de BEIT de 1000 ml, se justifica la siembra de 70 yemas axilares por BEIT. En 40 BEIT con una siembra individual de 50 yemas axilares y un coeficiente de brotación de yemas axilares de 9.84 se proyectaría obtener en tres semanas la cantidad de 19,680 plantas y si se aumenta la cantidad a 70 tejidos por BEIT con el coeficiente de brotación axilar de 8.76, se esperaría producir una cantidad de 24,528 plantas es decir 4848 plantas más en tres semanas. En el cuadro 5 se presenta el comportamiento estadístico de las variables evaluadas en los BEIT de acuerdo al número de plantas sembradas.

Cuadro 5. Efecto del número de plantas por BEIT en las variables longitud de planta, número de hojas, número de brotes, y número de raíces

Número de plantas por BEIT	Longitud de la planta en cm	Número de hojas	Número de brotes axilares	Número de raíces
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
50	9.67 ± 0.45a	4.62 ± 0.16a	9.84 ± 0.24a	7.64 ± 0.55a
60	10.78 ± 0.64a	4.8 ± 0.11a	9.47 ± 0.4ab	9.18 ± 0.85a
70	9.46 ± 0.79 a	4.76 ± 0.06a	8.76 ± 0.29b	7.96 ± 0.79a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.

Se debe considerar el volumen del medio de cultivo y la forma del recipiente que pueden afectar la composición del gas al interior de éste, y en consecuencia pueden afectar el crecimiento y desarrollo del cultivo (Pereira *et al.*, 2006).

4.3. Fase de enraizamiento

El papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocido, recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de cultivo de enraizamiento y es precisamente el AIA una de las auxinas más empleadas en esta fase (Vásquez y Tórriz, (1981); Hu y Wang, (1983) citados por Hernández y Rugama (1998).

No se presentaron diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos en las variables longitud y número de hojas por planta.

En número de brotes axilares producidos en el tratamiento testigo y en la variante de medio de cultivo que se le adicionó 0.25 mg/L⁻¹ de AIA superaron significativamente a los valores de las medias registradas cuando se adicionaron concentraciones de AIA de 0.50, 0.75 y 1.00 mg/L⁻¹. Este comportamiento de los tejidos tiene su explicación en que las auxinas actúan de forma antagónica a las citoquininas, por tanto, en la medida de que se incrementó la adición de AIA a las variantes de medios de cultivo fue mayor la dominancia apical y disminuyó la brotación axilar.

Otra respuesta que confirma el efecto favorable del AIA fue en la emisión de raíces y de acuerdo a los resultados su número se incrementó en las variantes de medios de cultivo que contenían mayor concentración de AIA. No obstante, no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos que se les adicionó AIA, pero sí entre el tratamiento testigo y las variantes de medios de cultivo con adiciones de 0.75 y 1.00 mg/L⁻¹ de AIA favoreciendo el crecimiento de raíces. Los resultados obtenidos en el experimento de enraizamiento se presentan en el cuadro 6. En la figura 5 se observan plantas en fase de enraizamiento a las tres semanas de permanecer en BEIT.

Cuadro 6. Efecto del AIA en longitud de planta, número de hojas, número de brotes y número de raíces del cultivar caña de azúcar CC-06791 en fase de enraizamiento a las tres semanas

Regulador de crecimiento mg/ ⁻¹ AIA	Longitud de planta en cm	Número de hojas	Número de brotes	Número de raíces
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
0.0	9.62 ± 1.30 a	3.87 ± 0.09 a	9.73 ± 0.54a	17.27 ± 1.59b
0.25	9.33 ± 0.85 a	3.84 ± 24 ^a	9.0 ± 0.36a	20.40 ± 0.81ab
0.50	9.18 ± 0.91 a	4.07 ± 0.17 ^a	7.4 ± 0.57b	20.31 ± 1.43ab
0.75	8.26 ± 1.06 a	3.67 ± 0.28a	7.07 ± 0.39b	20.67 ± 1.03a
1.00	8.15 ± 0.59 a	3.8 ± 0.11 ^a	6.98 ± 0.37b	20.91 ± 0.78a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.



Figura 5. Plantas caña de azúcar cultivar CC-06791 en fase de enraizamiento a las tres semanas.

El enraizamiento de plantas *in vitro* de caña de azúcar fue considerado un serio problema debido al efecto inhibitorio de cultivos continuos en medios con citoquininas durante la fase de multiplicación reportado por Sauvare y Galzy (1981) y Ballester (1983), de acuerdo a los resultados logrados con el cultivar CC- 06791 en los BEIT, no se observó ese efecto inhibitorio del BAP posiblemente a que en la fase de multiplicación se adicionaron dosis bajas.

4.4. Fase de aclimatación

En la fase de aclimatación se estudió el efecto de la aplicación de dos productos biofertilizantes el PROTIFERT LMW y el MILAGRO PROMET en base a la respuesta de las variables longitud de planta, número de hojas, número de brotes axilares y número de raíces. Cuando el PROTIFERT LMW fue asperjado durante 5 semanas a razón de una aplicación por semana la longitud de planta registró mejor respuesta estadística con una media de 14.07 cm, en comparación con los tratamientos testigo que solo se regó con agua y los tratamientos 1 y 2 que presentaron medias correspondientes de 7.96, 8.27 y 8.96 cm. Aplicaciones de PROTIFERT LMW hasta las semanas 3, 4 y 5 no reflejaron diferencias estadísticas entre ellos. En número de hojas únicamente en el tratamiento que se le aplicó el PROTIFERT LMW una vez por semana hasta la semana 5 se obtuvo la categoría estadística inferior mientras que entre los otros

tratamientos la respuesta estadística fue similar. En cuanto al número de brotes axilares los tratamientos testigos y aplicación del biofertilizante en la primera semana presentaron igual comportamiento estadístico, el tratamiento testigo superó estadísticamente a las medias obtenidas con aplicaciones a las 2, 3, 4 y 5 semanas.

El volumen de raíces de acuerdo a los resultados estadísticos se observó que solo fue significativamente superior cuando el PROTIFERT LMW se aplicó constantemente durante 5 semanas en comparación cuando no se adicionó el producto. Las medias obtenidas entre el tratamiento testigo y las aplicaciones en los tratamientos 1, 2, 3 y 4 no presentaron diferencias estadísticas entre sí. El efecto favorable del PROTIFERT LMW en las variables longitud de plantas y en el volumen de raíces no puede estar influenciado por el contenido de aminoácidos y péptidos en la formulación del producto por que no favorecen la brotación axilar. Los resultados de las variables evaluadas se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Efecto del bio-estimulante orgánico PROTIFERT LMW en fase aclimatación del cultivar de caña de azúcar CC06-791

Tratamientos con PROTIFERT LMW en Semanas	Longitud de planta en cm	Número de hojas	Números de brotes axilares	Volumen de raíces en cm ³
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
Testigo (0)	7.96 ± 1.23b	5.53 ± 0.24ab	3.4 ± 0.23a	1.73 ± 0.48b
1	8.27 ± 1.47b	5.73 ± 0.37a	3.13 ± 0.13ab	2.53 ± 1.01ab
2	8.96 ± 1.54b	5.4 ± 0.35abc	2.53 ± 0.27c	2.93 ± 1.22ab
3	10.37 ± 1.14ab	5.13 ± 0.13abcd	2.6 ± 0.12bc	3.60 ± 0.9ab
4	11.83 ± 1.7ab	5.47 ± 0.55ab	2.2 ± 0.2c	4.27 ± 0.18ab
5	14.07 ± 1.52a	4.4 ± 0.42d	2.27 ± 0.07c	4.80 ± 0.4a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.

En longitud de planta es una variable que refleja que en el proceso de aclimatación de caña de azúcar es necesaria la fertilización. Al igual que el producto PROTIFERT LMW, el biofertilizante MILAGRO PROMET contribuyó a incrementar el promedio de longitud de planta, principalmente cuando las aplicaciones se hicieron conforme a los tratamientos 4 y 5.

Por tanto no es suficiente para lograr una buena longitud de plantas aplicar solamente agua o aplicar MILAGRO PROMET de acuerdo a los tratamientos 2 y 3. En número de brotes axilares se obtuvo la mejor respuesta estadística cuando se aplicó el tratamiento 1 con media de 3.8 brotes axilares, esta media solamente superó estadísticamente a la media lograda en el tratamiento 4 con 2.2 en brotes axilares.

El volumen de raíces producidas por efecto del producto MILAGRO PROMET indica que el efecto estimulante en la producción de raíces resultó más efectivo cuando se aplicó en los tratamientos 4 y 5. Se observó una respuesta estadística similar entre las medias del tratamiento testigo y la aplicación del producto de acuerdo a los tratamientos 1, 2 y 3. Cuadro 8.

Cuadro 8. Efecto del bioestimulador del crecimiento MILAGRO PROMET en fase aclimatación del cultivar de caña de azúcar CC06-791

Tratamientos con MILAGRO PROMET en Semanas	Longitud de planta	Número de hojas	Números de brotes axilares	Volumen de raíces en cm ³
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
0	7.01±0.58d	5.20 ±0.23a	2.87 ± 0.24ab	1.47±0.37c
1	9.48±0.41c	4.93 ±0.44ab	3.8 ± 0.92a	1.6±0.23c
2	10.17±0.97c	4.63 ±0.09ab	2.53 ± 0.27b	2.0±0.12c
3	12.47±0.34b	4.73 ±0.13ab	2.6 ± 0.64ab	2.07±0.33bc
4	13.56±0.19ab	4.37 ±0.15b	2.2 ± 0.42b	3.2±0.42ab
5	14.27±0.20a	4.27 ±0.18b	2.6 ± 0.82ab	3.4±0.58a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.

Las plantas del cultivar de caña de azúcar CC-06791 presentaron un promedio de supervivencia entre 84.6% y el 88.3% con la aplicación del producto PROTIFERLMW, lográndose el mayor promedio de supervivencia cuando se aplicó el tratamiento 1. Mientras que con la aplicación del producto MILAGRO PROMET se obtuvieron porcentajes de supervivencia comprendidos entre el 81 y el 85%. Las diferentes aplicaciones efectuadas con el producto biofertilizante PROTIFERLMW en el presente estudio superaron al porcentaje de supervivencia reportado por Hernández y Rugama en 1998 en el cultivar de caña de azúcar ISA-96-110. Sin embargo, con el producto MILAGRO PROMET únicamente con las aplicaciones realizadas en los tratamientos 3, 4 y 5 resultaron superiores a los promedios de supervivencia reportados por esos

mismos autores en cultivar de caña de azúcar ISA-96-110. Los porcentajes de supervivencia se aprecian en la figura 6.

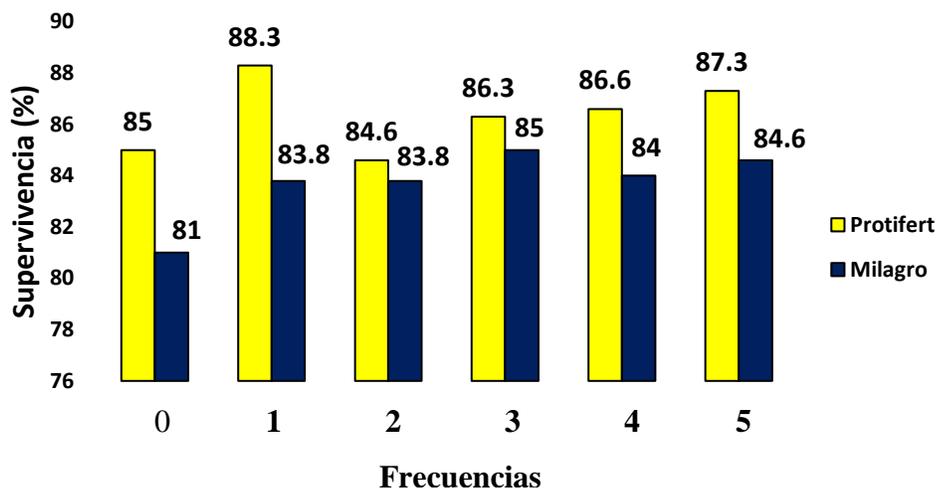


Figura 6. Efecto de la fertilización con PROTIFERT LMW y MILAGRO PROMET en la supervivencia de platas de caña de azúcar cultivar CC-06791 aclimatadas.

En la figura 7 se presenta una muestra de plantas evaluadas a las seis semanas de aclimatadas.



Figura 7. Plantas caña de azúcar cultivar CC-06791 en fase de aclimatación a las seis semanas.

V. CONCLUSIONES

En la fase de multiplicación del cultivar de caña de azúcar CC-06791 se puede adicionar a los medios de cultivo concentraciones de BAP entre 0.30 y 0.40 mg/l⁻¹.

La siembra en BEIT con capacidad de 1000 ml de densidades entre 50 y 60 plantas favoreció la formación de un mayor promedio de brotes axilares. Si el objetivo es la producción comercial de plantas, se pueden sembrar 70 plantas por BEIT aunque el coeficiente de multiplicación resulte estadísticamente inferior.

El número de raíces se incrementó en las variantes de medios de cultivo que contenían mayor concentración de AIA. Con adiciones de 0.75 y 1 mg/l⁻¹ de AIA se obtuvieron medias respectivas de 20.67 y 20.91 raíces por planta.

En la fase de aclimatación aplicaciones con el tratamiento 5 de los biofertilizantes PROTIFERT LMW y MILAGRO PROMET permitieron que las plantas tuvieran los mayores promedios en las variables longitud de plantas y volumen de raíces.

La supervivencia de las plantas fue mayor con el producto PROTIFER LMW cuando se aplicó el tratamiento 1 con el 83.3%. Mientras que con el producto MILAGRO PROMET el porcentaje de supervivencia fue del 85% en el tratamiento 3.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones tomando en cuenta factores como la frecuencia y el tiempo de inmersión de los tejidos, volúmenes mayores de los BEIT, temperatura y horas luz en el cuarto de crecimiento que pueden ser determinantes en la micropropagación a escala comercial del cultivar CC-06791 de caña de azúcar.

Estudiar el comportamiento de las plantas *in vitro* de caña de azúcar cultivar CC-06791, en condiciones de campo para evaluar su manejo agronómico, el comportamiento fisiológico y la estabilidad genética.

VII. LITERATURA CITADA

- Aguilar Maradiaga, M. 2014. *Propuesta de Biorreactores económicos de inmersión temporal elnuevodiario (BEIT) para la producción de plantas in vitro a escala comercial*. VII Edición del Premio Nacional a la innovación. Managua, NIC.19 p.
- Albarrán, J. Salazar, E. Trujillo, I. Silva, A. INIA-CENIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Unidad de Biotecnología). *Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas*. 2014. Maraca, Aragua. 2-5 p. Recuperado de. http://sian.inia.gob.ve/inia_divulga/divulga_28/rid28_albarran_2-8.pdf
- Barba, A, Luna, B. y Romero, J. 2001. *Micropropagación de Plantas*. México: Trillas, S.A. de C.V. 107 p.
- Bejarano, M. 2018. *Nicaragua producirá 18 millones de quintales de azúcar*. El nuevo diario (En línea). Managua, NIC, enero 10 2018. Recuperado de. <https://www.com.ni/economia/452224-nicaragua-producira-18-millones-quintales-azucar/>
- Castro, S. E. y Maradiaga, E. E. 2015. *Micropropagación tradicional y del empleo de Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal en el cultivar de plátano (Musa spp.) CEMSA ¾*. (Tesis pregrado) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Recuperado de. <http://repositorio.una.edu.ni/3273/1/tnf01r672.pdf>
- Compañía Azucarera del Sur S.A. CASUR. 2017. *Varietades de Caña de azúcar cultivadas en Nicaragua*. IV edición. Rivas, NIC. 2-6p.
- Escalona, M. 2006. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta* anual. 48-50 p.
- Etienne, H and Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 215-231p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (1988). *La caña de azúcar como pienso*. Memorias de una consulta de expertos de la FAO, Santo Domingo, RD. 86. 319p.
- Fauconier, K. Basse Reau, D. 1975. *La caña de azúcar Barcelona*. ES: Blume. 52p.

- Hartmann, H y Kester, D. 1991. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Ed. Continental, VI. México. 220-235 p.
- Hernández, D. Rugama, C. 1998. *Micropropagación de dos clones de caña de azúcar (Saccharum sp.) ISA 96-110 E ISA96-111*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Agraria. Managua Nicaragua. Recuperado de. <http://repositorio.una.edu.ni/1940/1/tnf02h557.pdf>
- Jiménez, E.; Pérez N.; de Feria M.; Barbón R.; Capote A.; Chávez M.; Quiala, E y Pérez JC. 1999. Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19-23 p
- Muños, R. 2004. *La micropropagación de caña de azúcar y sus implicaciones*. EEZ-CSIC. Madriz, ES. 20p.
- Naik, G. 2001. *Sugarcane Biotechnology*. Tissue culture studies in sugarcane. United States of America: Science Publishers, INC. 25-50 p.
- Pereira, F.D.; Pinto, J.E.; Rodríguez, H.C.; Rosado, L.D.; Beijo, L.A.; Lameira, O.A. 2006. Proliferação in vitro de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio. *Plant Cell Culture and Micropropagation* 2. 53-106 p .
- Pérez, J. N. 1998. En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba. 83-295 p.
- Pérez, P. 1991. *Cultivo de tejidos en la caña de azúcar: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, CO: In: Roca, W.M. y Mroginski, L. A. 543-558p.
- Ramírez, M. (2008). *Cultivos para la producción sostenible de biocombustible: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos*. Caña de azúcar. Servicio Holandés de Cooperación al Desarrollo SNV. TE, Honduras. Comunica. 16 p. Recuperado de. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:fMIUsOIWbY8J:www.bibalex.org/Search4Dev/files/289330/120295.pdf+&cd=10&hl=es-419&ct=clnk&gl=ni>
- Rangel, E; Hernandez, E; Hernandez, M. 2016. *Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en Mexico*. (Tesis de postgrado). Colegio de Postgraduados. Mexico. Recuperado de. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000300225.

- Teisson, C. y D; Alvarad, 1997. Técnicas de Avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG 1997. 25 – 26p.
- Sauvaire, D; Galzy, R. 1981. *Micropropagation de la canne a sucre par bouturage in vitro. Action de une auxine et de une cytokinine. L Agonomie Tropical*. Boston, USA. 264-469 p.
- Vázquez, B.E; Torres, S. 1995. Fisiología vegetal. Crecimiento y desarrollo. (ed.) Pueblo y Educacion. La Habana, Cuba. 317-362 p.