

OSMOTIC STRESS INDUCED BY POLYETHYLENE-GLYCOL ALTERS MACRONUTRIENT CONCENTRATIONS IN SUGARCANE (*Saccharum* spp.) PLANTS *IN VITRO*

EL ESTRÉS OSMÓTICO INDUCIDO POR POLIETILENGLICOL ALTERA LAS CONCENTRACIONES DE MACRONUTRIMENTOS EN PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.) *IN VITRO*

Odón Castañeda-Castro^{1,2}, Fernando C. Gómez-Merino^{2*}, Libia I. Trejo-Téllez³, Miriam C. Pastelín-Solano¹

¹Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Prolongación de Oriente 6 No. 1009. 94340. Orizaba, Veracruz. (odcastaneca@uv.mx), (mpastelin@uv.mx). ²Innovación Agroalimentaria Sustentable. Campus Córdoba. Colegio de Postgraduados. 94946. Amatlán de los Reyes, Veracruz. (fernandg@colpos.mx). ³Edafología. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (tlibia@colpos.mx).

ABSTRACT

The potential capacity of plant roots to absorb water and nutrients generally declines in osmotic-stressed plants, presumably because of a reduction in the nutrient element demand, and such decrease varies among plant genotypes. In order to investigate the effect of the osmotic stress caused by polyethylene-glycol 6000 (PEG) on the macronutrient concentration in sugarcane (*Saccharum* spp.) *in vitro*, we established a factorial experiment with a completely randomized distribution. Study factors were variety (Mex 69-290 and CP 72-2086) and PEG in the nutrient medium (0, 3, 6 and 9 %, to generate osmotic potential corresponding to -0.18, -0.45, -0.65 and -0.80 MPa, respectively), which resulted in eight treatments, with five replicates each. The experimental unit consisted of a 500 mL flask, with 50 mL liquid MS medium, and three sugarcane plantlets each. Results were analyzed using an analysis of variance and means were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$). Plants were harvested 20 and 30 d after treatment (dat). In both varieties at 20 dat no effect on K, Ca, Mg and S concentrations was observed; however, N was lower in CP plants and P diminished in Mex plants. A different response was observed 30 dat with N, K, Ca, Mg and S concentrations higher in Mex plants, whereas P showed no differences between varieties due to the osmotic stress imposed by PEG. As for the osmotic stress, since PEG concentrations decreased in the nutrient medium, N and Ca concentrations diminished 20 dat, whereas N and K concentrations were lower 30 dat.

RESUMEN

La capacidad potencial de las raíces de las plantas para absorber agua y nutrientes generalmente disminuye cuando éstas son sometidas a estrés osmótico, probablemente debido a un decremento en la demanda nutrimental, y tal disminución varía entre genotipos. A fin de investigar el efecto del estrés osmótico ocasionado por polietilenglicol (PEG) en la concentración de macronutrientos en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) *in vitro*, se estableció un experimento factorial con distribución completamente al azar. Los factores de estudio fueron variedad (Mex 69-290 y CP 72-2086) y PEG en el medio de cultivo (0, 3, 6 y 9 %, para generar potenciales osmóticos de -0.18, -0.45, -0.65 y -0.80 MPa, respectivamente), con lo que se obtuvieron ocho tratamientos, con cinco repeticiones cada uno. La unidad experimental consistió en un frasco de 500 mL de capacidad, con 50 mL de medio de cultivo MS líquido, y tres plántulas de caña de azúcar cada uno. Los resultados se analizaron con un análisis de varianza y prueba de comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$). Las plantas se cosecharon 20 y 30 días después de aplicados los tratamientos (dat). En ambas variedades no se observaron efectos de los tratamientos en las concentraciones de K, Ca, Mg ni S; 20 dat pero la concentración de N fue menor en plantas CP, y la de P disminuyó en plantas Mex. Una respuesta diferente se observó 30 dat con concentraciones mayores de N, K, Ca, Mg y S en plantas Mex, en tanto que la concentración de P no mostró diferencias entre variedades debidas al estrés osmótico inducido por PEG. En cuanto al estrés osmótico, al disminuir las concentraciones de PEG en el cultivo, las concentraciones de N y Ca disminuyeron 20 dat, mientras que las de N y K se redujeron 30 dat. La interacción entre variedad y estrés osmótico mostró efectos altamente significativos para la mayoría de

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: January, 2015. Approved: September, 2015.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 49: 859-873. 2015.

Interaction between variety and osmotic stress showed highly significant effects on most minerals, with N and Ca being the most affected. In general, Mex 69-290 plants showed higher nutrient concentrations than CP 72-2086 plants under our experimental conditions.

Keywords: Plant nutrition, Poaceae, PEG, nitrogen, phosphorus, potassium.

INTRODUCTION

The availability of water for crops plays an important role in regulating plant growth and obtaining good yields. Globally, water deficits limit crop productivity more than any other environmental factor, especially for crops such as sugarcane, which demand large amounts of water and fertilizers.

Mexico is ranked as the sixth largest sugarcane producer in the world and has shown significant increments in yield from fields and factories (FAO, 2015; CONADESUCA, 2015). However, in environmental terms, the effects of global climate change on agricultural production in Mexico could reduce national agricultural production in 25.7 % (Moyer, 2010) if relevant strategic measures are not taken to address this global phenomenon. Under climate change, the water footprint of sugarcane might increase 2 % by 2020 and 3-4 % by 2050, whereas the available water is predicted to fall 4-7 % by 2020, and 6-8 % by 2050, with negative effects on crop yields (Haro *et al.*, 2013).

In fact, drought in Mexico, which was worsened by climate change, causes 80 % of all agricultural losses, which is noteworthy since 62 % of sugarcane acreage develops under rain-fed conditions (Senties-Herrera *et al.*, 2014). In these sugarcane production areas, episodes of water deficiency and hydric stress are becoming frequent, which hinder the genetic potential of sugarcane varieties to express their highest yields. As water availability is the major limiting factor for sugarcane productivity (Tammisola, 2010), studies that lead to an increase in sugarcane drought tolerance are needed to provide tools to allow sugarcane plantations in drier regions (da Silva *et al.* 2012; Vargas *et al.*, 2014). This is one of the greatest challenges for the sustainable expansion of sugarcane production that is carried out worldwide (Rudorff *et al.*, 2010; Senties-Herrera *et al.*, 2014).

los nutrientes, N y Ca fueron los más afectados. En general, las plantas de Mex 69-290 mostraron concentraciones mayores de nutrientes que las de CP 72-2086, en las condiciones experimentales aquí probadas.

Palabras clave: Nutrición vegetal, Poaceae, nitrógeno, fósforo, potasio.

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua en los cultivos tiene una función preponderante en la regulación del crecimiento vegetal y la obtención de buenos rendimientos. En el mundo, el déficit de agua limita la productividad de los cultivos más que ningún otro factor ambiental, especialmente en cultivos como la caña de azúcar que demandan grandes cantidades de agua y fertilizantes.

México es el sexto productor mayor de caña de azúcar en el mundo y ha mostrado incrementos significativos en rendimiento de campo y fábrica (FAO, 2015; CONADESUCA, 2015). Sin embargo, en términos ambientales, los efectos del cambio climático global podrían reducir en 25.7 % la producción agrícola nacional en el año 2080 (Moyer, 2010) si no se toman las medidas estratégicas pertinentes que permitan enfrentar este fenómeno global. En condiciones de cambio climático, la huella de agua de caña de azúcar podría incrementarse 2 % en el año 2020, y en 3 y 4 % en 2050, en tanto que la disponibilidad de agua podría disminuir entre 4 y 7 % para 2020, y entre 6 y 8 % en 2050, con efectos negativos en el rendimiento de los cultivos (Haro *et al.*, 2013).

De hecho, la sequía en México, que se ha agravado por efecto del cambio climático, causa el 80 % de las pérdidas agrícolas, lo cual es considerable dado que 62 % de la producción de caña de azúcar se desarrolla en condiciones de sequía (Senties-Herrera *et al.*, 2014). En estas áreas de producción de caña de azúcar, son cada vez más frecuentes los eventos de deficiencia de agua y estrés hídrico, lo cual dificulta que el potencial genético de las variedades de caña de azúcar exprese rendimientos máximos. Dado que la disponibilidad de agua es el principal factor limitante de la productividad de caña de azúcar (Tammisola, 2010), es necesario llevar a cabo estudios tendientes a incrementar la tolerancia de la caña de azúcar a la sequía, a fin de proveer herramientas que permitan el establecimiento exitoso de plantaciones de este cultivo

Drought causes several effects in sugarcane plants, including significant reduction in stomatal conductance, transpiration, and net photosynthesis (Smith *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2013; Gentile *et al.*, 2015), whereas leaf temperature increases (Rodrigues *et al.*, 2009; Graça *et al.*, 2010). Almost all sugarcane cultivars show decreased yields under drought, but some are more affected than others (Gentile *et al.*, 2015). Interestingly, a cultivar considered as sensitive to drought (i.e. reduced yield under drought stress) may be considered a useful cultivar. For example, Ribeiro *et al.* (2013) found that cultivar IACSP86-2042 had a 50 % reduction in stalk yield under drought stress, much higher than IACSP94-2094 (29 % reduction) and SP87-365 (no reduction); however, the absolute stalk yields of these cultivars were similar under drought conditions, as IACSP86-2042 had a much higher productivity under non-stressful conditions. Losses due to drought are not unusual and almost every year some sugarcane growing regions suffer mild to severe water shortages (Gentile *et al.*, 2015). Therefore, drought can cause major economic losses for sugarcane growers. Nevertheless, mild drought stress can have a positive impact on sugarcane yield. In irrigated fields, a period of drying off (water withheld) at the end of the season is a common practice. Apart from saving water and therefore costs associated with irrigation, this practice reduces soil compaction during harvest and may even increase sucrose content, as growth is more affected than photosynthesis and, as a result, assimilated CO₂ can be diverted from leaf and culm growth to sucrose accumulation in the culm (Singels *et al.*, 2000; Inman-Bamber, 2004). Therefore, the regulation of sugarcane responses to drought will show differences with those observed in other crops and model plants.

Water constitutes approximately 72 % of plant weight, as is the case with sugarcane, and is essential for physiological processes involved in conveying metabolites and nutrients (Cavali *et al.*, 2010). Therefore, in the event of water deficiency, nutrient imbalances can be observed in plant tissues. Although general mechanisms are identified for drought tolerance in plants, there are differences among species and cultivars as to how they respond to this type of stress, and responses vary according to plant developmental stage and stress duration and intensity. Sugarcane has a high demand for fertilizers (Senties-Herrera *et al.*, 2014), and little is known

en regiones más secas (da Silva *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2014). Este fenómeno es uno de los mayores desafíos para la expansión sustentable de la producción de caña de azúcar que se realiza en el mundo (Rudorff *et al.*, 2010; Senties-Herrera *et al.*, 2014).

La sequía causa varios efectos en caña de azúcar, incluyendo reducciones significativas en conductancia estomática, transpiración y fotosíntesis (Smith *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2013; Gentile *et al.*, 2015), en tanto que la temperatura de la hoja aumenta (Rodrigues *et al.*, 2009; Graça *et al.*, 2010). Casi todos los cultivares de caña de azúcar muestran reducción en rendimientos debido a la sequía, aunque algunos son más afectados que otros (Gentile *et al.*, 2015). Lo que resulta interesante es que un cultivar considerado como sensible a sequía (esto es, que reduce su rendimiento frente a este fenómeno) puede considerarse como un cultivar útil en términos agronómicos. Por ejemplo, Ribeiro *et al.* (2013) encontraron que el cultivar IACSP86-2042 mostraba una reducción del 50 % en el rendimiento de tallos en sequía, indicador mucho más alto que el del cultivar IACSP94-2094 (solo 29 % de reducción) y SP87-365 (sin reducción por sequía); sin embargo, los rendimientos absolutos de tallos de estos cultivares fueron similares, porque el cultivar IACSP86-2042 mostró productividad mayor en condiciones favorables de disponibilidad de agua en el tratamientos testigo. Las pérdidas ocasionadas por sequía son cada vez más frecuentes, y casi cada año algunas regiones donde se produce caña de azúcar enfrentan problemas de reducida disponibilidad de agua en rangos de medios a severos (Gentile *et al.*, 2015). Por tanto, la sequía puede causar pérdidas económicas considerables a los productores de caña de azúcar. No obstante, la sequía intermedia puede tener un impacto positivo en el rendimiento de caña de azúcar. De ahí que en condiciones de riego, al final de la estación de crecimiento de las plantas se aplique un periodo de sequía inducida, como una práctica cultural común. Además de ahorrar agua y costos asociados al riego, esta práctica reduce la compactación del suelo durante la cosecha y puede incrementar el contenido de sacarosa, dado que el crecimiento es más afectado que la fotosíntesis, y como resultado, el CO₂ asimilado puede redirigirse del crecimiento de hojas y tallos hacia la acumulación de sacarosa en tallos (Singels *et al.*, 2000; Inman-Bamber, 2004). De ahí que la regulación de las respuestas de la caña de azúcar muestra diferencias respecto a las observadas en otras especies.

about the effects of osmotic stress on the absorption and concentration of nutrients in its tissues under water deficit. In order to modify the osmotic potential of a nutrient solution and thereby induce water stress in a controlled manner, it is common to use polyethylene-glycol (PEG), especially in protocols for hydroponics experiments. Because PEG has a 6000 or 8000 molecular size and does not penetrate plant tissues, it is ideal for generating osmotic stress in nutrient solutions (Lagerwerff *et al.*, 1961; Money, 1989). Therefore, the objective of our study was to analyze the concentrations of N, P, K, Ca, Mg and S in the stems of sugarcane varieties Mex 69-290 (Mex) and CP 72-2086 (CP), in response to water stress caused by the application of PEG 6000 in nutrient solution *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growing medium

Seedlings from varieties Mex 69-290 and CP 72-2086, the two most cultivated in Mexico (Senties-Herrera *et al.*, 2014), were used for *in vitro* culture on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 100 %, and supplemented with 2 % sucrose (w/v), myo-inositol (100 mg L⁻¹), thiamine (50 mg L⁻¹), pyridoxine (100 mg L⁻¹), niacin (50 mg L⁻¹), glycine (300 mg L⁻¹), biotin (100 mg L⁻¹), arginine (50 mg L⁻¹) and ascorbic acid (50 mg L⁻¹). The pH of the medium was adjusted to 5.7±0.1 and remained in a liquid state throughout the experiment. The liquid culture medium was placed in 500 mL flasks which were sterilized in an autoclave (Lab-Tech model LAC5060s; Namyangju, South Korea) at 120 °C for 20 min.

Sugarcane varieties Mex 69-290 and CP 72-2086 were generated under different environmental conditions and from different genotypes and breeding programs. Mex 69-290 resulted from the hybridization between the Mexican varieties Mex 56-476 and Mex 53-142 under rain-fed conditions in Córdoba, Veracruz, Mexico (Gómez-Merino and Senties-Herrera, 2015), whereas the American variety CP 72-2086 was produced by the crossing between the American varieties CP 62-374 and CP 63-588 from Canal Point, Florida (USA), under irrigated conditions (Schueneman *et al.*, 2008).

Experimental conditions, experimental design and statistical analysis

Seedlings were maintained in growth chambers under controlled conditions of 16 h light, 23 °C and 75 % relative humidity.

El agua constituye aproximadamente 72 % del peso de plantas como la caña de azúcar, y es esencial para los procesos fisiológicos involucrados en el transporte de metabolitos y nutrimentos (Cavali *et al.*, 2010). Por ello es que en eventos de deficiencia de agua, es posible observar desbalances nutrimentales en tejidos. Aunque los mecanismos generales de tolerancia a la sequía en plantas están bien identificados, existen diferencias en la respuesta entre variedades y cultivares y las respuestas varían de acuerdo con la etapa de desarrollo de la planta y de la duración e intensidad del estrés. La caña de azúcar presenta demanda alta de fertilizantes (Senties-Herrera *et al.*, 2014), y se sabe de los efectos del estrés osmótico en la absorción y concentración de nutrimentos en sus tejidos en condiciones de déficit de agua. Con la finalidad de modificar el potencial osmótico en el medio de cultivo para inducir estrés hídrico de manera controlada, es común el uso de polietilenglicol (PEG), especialmente en protocolos hidropónicos. Debido a que el PEG tiene un tamaño molecular de 6000 y 8000, y no penetra el tejido vegetal, es ideal para generar estrés osmótico en soluciones nutritivas (Lagerwerff *et al.*, 1961; Money, 1989). Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la concentración de N, P, K, Ca, Mg y S en vástagos de las variedades de caña de azúcar Mex 69-290 (Mex) y CP 72-2086 (CP), en respuesta al estrés hídrico causado por la aplicación de PEG 6000 en la solución nutritiva *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y medio de crecimiento

Plántulas de las variedades Mex 69-290 y CP 72-2086, las dos más cultivadas en México, se usaron para cultivo *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100 %, complementado con sacarosa al 2 % (p/v), mio-inositol a 100 mg L⁻¹, tiamina a 50 mg L⁻¹, piridoxina a 100 mg L⁻¹, ácido nicotínico a 50 mg L⁻¹, glicina a 300 mg L⁻¹, biotina a 100 mg L⁻¹, arginina a 50 mg L⁻¹ y ácido ascórbico a 50 mg L⁻¹. El pH del medio se ajustó a 5.7±0.1 y permaneció en estado líquido durante el desarrollo del experimento. El medio de cultivo líquido fue depositado en frascos de 500 mL, y fueron esterilizados en un autoclave vertical (Lab-Tech modelo LAC5060s; Namyangju, Corea del Sur) a 120 °C por 20 min.

Las variedades de caña de azúcar Mex 69-290 y CP 72-2086 fueron generadas en condiciones ambientales diferentes y desde diferentes genotipos y programas de mejoramiento. La variedad

The study had a factorial design with a completely randomized distribution. The factors were: 1) Sugarcane variety (VAR; Mex69-290 and CP 72-2086), and 2) Peg 6000 in the culture medium (PEG). Four levels of polyethylene-glycol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) were tested as causative agent of water stress in the culture medium: 0, 3, 6 and 9 % for generating osmotic potentials equivalent to -0.18 , -0.45 , -0.65 and -0.80 MPa, respectively. The osmotic potential were monitored with a cryoscopic osmometer (Osmomat-030, Gonotec GmbH, Berlin, Germany). Treatments had five replicates and each replicate consisted of a 500 mL flask with 50 mL of culture medium, culture medium and three seedlings of each sugarcane variety.

The data were analyzed using ANOVA and Tukey means comparison test ($p \leq 0.05$) with SAS (2011).

Nutrient analyses

After 20 and 30 d of establishment in the liquid culture medium with four levels of PEG, the plants were extracted to analyze tissue nutrient concentrations. Plants were dried at 72 °C for 48 h in a forced air oven. Once dried, the samples were finely ground using a Thomas-Wiley Laboratory Mill with a 1.0 mm sieve (Model 4, Philadelphia, PA, USA). Nitrogen concentrations were determined using the Semi-micro Kjeldahl method (Bremner, 1965), whereas the other macronutrients were determined using wet digestion of the dried material with a mixture of nitric and perchloric acids (Alcántar and Sandoval, 1999). Readings of the extracts, obtained after digestion and filtration, were made using an inductively-coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-OES Agilent™ 725; Melbourne, Australia).

RESULTS AND DISCUSSION

Since its discovery as an efficient osmotic stressor (Lagerwerff *et al.*, 1961), PEG is used to induce controlled water deficits in plants under appropriate experimental protocols (Labanowska *et al.*, 2013). Its immobility and lack of toxicity to plant cells make PEG an osmolyte suitable for plant physiological studies (Al-Bahrany, 2002). Furthermore, as it does not react with other chemical and biological substances, PEG is the most applicable substance for experimentally inducing biological osmotic pressure (Macar *et al.*, 2009). In our study, PEG altered osmotic pressure in the liquid nutrient medium, dropping it from -0.18 MPa in the control to -0.80 MPa in containers with 9 % PEG 6000. This decrease in osmotic potential resulted in altered nutrient uptake and concentration in sugarcane plants.

Mex 69-290 proviene de la hibridación entre las variedades mexicanas Mex 56-476 y Mex 53-142 en condiciones de temporal que predominan en Córdoba, Veracruz (Gómez-Merino y Senties-Herrera, 2015), mientras que la variedad estadounidense CP 72-2086 fue producida al cruzar las variedades CP 62-374 y CP 63-588 de Canal Point, Florida, en condiciones de riego (Schueneman *et al.*, 2008).

Condiciones experimentales, diseño experimental y análisis estadístico

Las plántulas fueron mantenidas en cámaras de crecimiento con condiciones controladas: 16 h luz, 25 °C, 75 % de humedad relativa.

El estudio tuvo un diseño factorial con distribución completamente al azar. Los factores fueron: 1) Variedad de caña de azúcar (VAR; Mex 69-290 y CP 72-2086), y 2) concentración de PEG 6000 en el medio de cultivo (PEG). Cuatro niveles de polietilenglicol 6000 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) se probaron como agente causante de estrés hídrico en el medio de cultivo: 0, 3, 6 y 9 %, para generar potenciales osmóticos correspondientes a -0.18 , -0.45 , -0.65 y -0.80 MPa, respectivamente. Los potenciales osmóticos fueron medidos con un osmómetro crioscópico (Osmomat-030; Gonotec GmbH; Berlín, Alemania). Los tratamientos tuvieron cinco repeticiones, y cada repetición consistió en un frasco de 500 mL con 50 mL de medio de cultivo, los tratamientos y tres plántulas de cada variedad de caña de azúcar.

Con los datos se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) usando SAS (2011).

Análisis de nutrimentos

Después de 20 y 30 d de su establecimiento en el medio de cultivo líquido con cuatro niveles de PEG, las plantas fueron extraídas para analizar contenidos nutrimentales en sus tejidos. Las plantas fueron secadas a 72 °C por 48 h en estufa de aire forzado. Una vez secas, las muestras fueron molidas finamente en un molino de laboratorio marca Thomas-Wiley (Modelo 4; Filadelfia, PA) con criba de 1.0 mm. Las concentraciones de N fueron determinadas por el método Semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965), en tanto que las de los demás macronutrientes fueron determinados por digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos nítrico y perclórico (Alcántar y Sandoval, 1999). Las lecturas de los extractos obtenidos después de la digestión y filtrado, se realizaron en un equipo de espectroscopía de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES Agilent™ 725; Melbourne, Australia).

Effect of individual factors and their interaction on plant nutrient concentrations

Significant effects from PEG concentrations, sugarcane varieties and their interactions on N concentrations were observed in sugarcane plants 30 d after treatment (dat). Furthermore, significant effects from PEG concentrations were observed on Ca and K concentrations in sugarcane plants 20 and 30 dat, respectively. Sugarcane variety significantly affected N, Mg and S concentrations 20 dat, and the concentrations of N and Ca 30 dat. The interactions between PEG concentration and sugarcane variety were significant for P and K at 20 dat, and for N at 30 dat (Table 1).

Effect of varieties on plant nutrient concentrations

Mex 69-290 had higher macronutrient concentrations than CP 72-2086 (Table 2). Nitrogen and magnesium concentrations were higher in the former variety at 20 and 30 dat, whereas K, Ca and S changed only at 30 dat. Variety CP 72-2086 showed higher P concentrations at 20 dat, although at 30 dat both varieties displayed the same P concentrations.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento como un eficiente agente causante de estrés osmótico (Lagerwerff *et al.*, 1961), el PEG es usado para inducir déficits hídricos controlados en plantas en protocolos experimentales (Labanowska *et al.*, 2013). Su movilidad y ausencia de toxicidad en células vegetales hacen del PEG un osmolito adecuado para estudios de fisiología vegetal (Al-Bahrany, 2002). Además, como éste no reacciona con sustancias químicas ni biológicas, es el sustrato más aplicable para la inducción experimental de presión osmótica en sistemas biológicos (Macar *et al.*, 2009). En este estudio, el PEG alteró la presión osmótica en el medio de cultivo líquido, lo que ocasionó una caída del -0.18 MPa en el tratamiento testigo (en frascos que no contenían PEG 6000) a -0.80 MPa en los frascos con 9 % PEG 6000. Este decremento en el potencial osmótico ocasionó alteraciones en la absorción y concentración nutrimental en las plantas de caña de azúcar analizadas.

Table 1. Effect of polyethylene-glycol (PEG) concentration in the nutrient solution, variety (VAR) and the interactions among both study factors on macronutrient concentrations in sugarcane plants *in vitro* under osmotic stress induced by PEG 6000, 20 and 30 d after treatment (dat).

Cuadro 1. Efecto del polietilenglicol (PEG) en la solución nutritiva, variedad (VAR) y de las interacciones entre ambos factores de estudio en las concentraciones de macronutrientes de plantas de caña de azúcar sometidas a estrés osmótico inducido por PEG 600 *in vitro* 20 y 30 dat.

Study factor	Degrees of freedom	20 dat						30 dat					
		N	P	K	Ca	Mg	S	N	P	K	Ca	Mg	S
Polyethylene-glycol level (PEG)	3	ns	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	ns
Variety (VAR)	1	*	ns	ns	ns	*	*	**	ns	*	**	*	*
Interaction (PEG*VAR)	3	ns	*	*	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
CV		12.6	7.5	11.1	15.9	12.7	7.8	4.1	26.9	20.9	18.7	14.4	15.5

ns: not significant; *: significant $p \leq 0.05$; **: highly significant $p \leq 0.01$. PEG concentrations were 0, 3, 6 and 9 %, generating osmotic potentials equivalent to -0.18 , -0.45 , -0.65 and -0.80 MPa, respectively. Sugarcane varieties were Mex 69-290 and CP 72 20-86 ♦ ns: no significativo; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$. dat: días después de aplicados los tratamientos. Las concentraciones de PEG probadas fueron 0, 3, 6 y 9 %, que generaron potenciales osmóticos correspondientes a -0.18 , -0.45 , -0.65 y -0.80 MPa, respectivamente. Las variedades de caña de azúcar evaluadas fueron Mex 69-290 y CP 72-2086.

Table 2. Effect of the factor variety on the macronutrient concentrations of sugarcane plants under osmotic stress induced by PEG 6000 *in vitro*, 20 and 30 d after treatment.**Cuadro 2. Efecto del factor variedad en las concentraciones de macronutrientes de caña de azúcar bajo estrés osmótico inducido por PEG 6000 *in vitro* 20 y 30 dat.**

Variety	N		P		K (g kg ⁻¹)		Ca		Mg		S	
	Days after treatment											
	20	30	20	30	20	30	20	30	20	30	20	30
Mex 69-290	10.9a	14.3a	2.8b	1.1a	26.7a	2.2a	2.8a	0.7a	1.8a	0.5a	3.4a	1.1a
CP 72-2086	7.9b	8.9b	3.2a	1.1a	23.5a	1.1b	2.3a	0.3b	1.4b	0.3b	3.1a	0.8b

Different letters in a column indicate statistical differences ($p \leq 0.05$) between varieties. PEG concentrations were 0, 3, 6 and 9 %, generating osmotic potentials equivalent to -0.18 , -0.45 , -0.65 and -0.80 MPa, respectively. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre variedades. Las concentraciones de PEG probadas fueron 0, 3, 6 y 9 %, con potenciales osmóticos correspondientes a -0.18 , -0.45 , -0.65 y -0.80 MPa, respectivamente.

Effect of PEG on plant nutrient concentrations

The analysis of the effect of PEG concentration as an independent factor showed that N concentrations decreased in sugarcane plants at 20 and 30 dat with increased PEG concentration in the nutrient medium (Table 3). Besides, K concentrations in plants decreased with concentrations of PEG in the nutrient medium at 30 dat, whereas for Ca it was at 20 dat. All other nutrient concentrations did not change in response to the treatments tested.

Efecto individual y de las interacciones de los factores de estudio en las concentraciones nutrimentales en planta

Efectos significativos se observaron en concentración de PEG, variedades de caña de azúcar y en sus interacciones en la concentración de N 30 d después de aplicados los tratamientos (dat). También se observaron efectos significativos del factor PEG en las concentraciones de Ca y K en plantas de caña de azúcar 20 y 30 dat, respectivamente. El factor variedad

Table 3. Effect of the factor PEG concentration on the macronutrient concentrations of sugarcane plants under osmotic stress induced by PEG 6000 *in vitro*, 20 and 30 d after treatment.**Cuadro 3. Efecto del factor concentración de PEG en las concentraciones de macronutrientes en plantas de caña de azúcar sometidas a estrés osmótico inducido por PEG 6000 *in vitro* 20 y 30 dat.**

PEG concentration in the nutrient medium (%; w/v)	N		P		K (g kg ⁻¹)		Ca		Mg		S	
	Days after treatment											
	20	30	20	30	20	30	20	30	20	30	20	30
0	16.6a	11.5a	3.0a	0.9a	26.9a	2.7a	3.6a	0.5a	1.9a	0.4a	3.3a	0.9a
3	11.9b	7.5b	3.0a	0.8a	26.4a	1.0b	2.7ab	0.5a	1.7a	0.3a	3.2a	0.7a
6	10.1c	9.6ab	2.9a	1.3a	22.3a	1.4b	2.0b	0.4a	1.4a	0.5a	3.2a	1.2a
9	8.0d	8.9ab	2.9a	1.4a	24.8a	1.2b	1.9b	0.4a	1.4a	0.3a	3.3a	0.8a

Different letters a column indicate statistical differences ($p \leq 0.05$) among PEG concentrations in the nutrient medium. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre concentraciones de PEG en el medio nutritivo.

Plant nutrient concentrations as affected by the interaction of study factors

The analysis of the effect of the interaction PEG x VAR on micronutrient concentrations in plant tissues, showed that differences were most evident at 30 dat, especially for K, Mg and S concentrations (Figure 1).

Nitrogen concentrations were significantly different at 20 and 30 dat, but were most evident at 30 dat, especially for CP 72-2086. No significant effects were observed for P at 20 or 30 dat. Potassium concentrations were not affected at 20 dat, but were significantly reduced 30 dat. Calcium was significantly reduced at 20 dat in both varieties, whereas the variety CP 72-2086 showed significant effects at 30 dat. Similarly, Mg concentrations were significantly reduced at 30 dat, and the variety CP 72-2086 was more affected. Finally, S concentrations did not change in response to osmotic potentials in either variety at 20 dat, although a reduction was evident at 30 dat in the variety CP 72-2086.

To our understanding, this is the first study reporting the effects of osmotic stress induced by PEG on sugarcane macronutrient concentrations *in vitro*. Importantly, N and Ca concentrations were significantly affected by PEG treatments under our experimental conditions. Nitrogen is a primary plant nutrient that is highly important in achieving maximum crop productivity and sugarcane absorbs N in greater amounts than any other essential nutrient because this mineral element is a crucial component of all enzymes and other vital molecules such as chlorophylls and nucleic acids (McCray *et al.*, 2013). Thus, N is necessary for plant growth, development and performance. As N uptake, biomass production, yield and sugar production are strongly correlated, the N requirement of sugarcane is large and must be in balance with other nutrients, especially if plants are exposed to environmental stressors such as drought (Bäzinger *et al.*, 2000). According to Villar-Salvador *et al.* (2013), maintaining a low N content allows plants experiencing water stress to overcome such events. Nitrogen, as ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-), has different effects on gas exchange parameters (Guo *et al.*, 2007). Zhang *et al.* (2011) reported that increased NO_3^- nutrition plays a favored anti-oxidative metabolic role, compared with NH_4^+ nutrition in plants, thereby

de caña de azúcar afectó significativamente las concentraciones de N, Mg y S 20 dat, y las concentraciones de N y Ca 30 dat. Las interacciones entre los factores concentración de PEG y variedad de caña de azúcar fueron significativas para P y K 20 dat, y para N 30 dat (Cuadro 1).

Efecto del factor variedad en la concentración nutrimental de plantas

La variedad Mex 69-290 mostró mayores concentraciones nutrimentales que la variedad CP 72-2086 (Cuadro 2). Las concentraciones de N y Mg fueron mayores en la primera variedad 20 y 30 dat, en tanto que las de K, Ca y S cambiaron solo 30 dat. La variedad CP 72-2086 mostró mayores concentraciones de P 20 dat, aunque 30 dat ambas variedades mostraron las mismas concentraciones de este nutrimento.

Efecto del factor PEG en la concentración nutrimental en planta

El análisis del efecto de la concentración de PEG como un factor independiente mostró que las concentraciones de N decrecieron en plantas de caña de azúcar 20 y 30 dat al incrementar la concentración de PEG en el medio de cultivo (Cuadro 3). Adicionalmente, las concentraciones de K en plantas decrecieron al incrementar las concentraciones de PEG en el medio de cultivo 30 dat, en tanto que las de Ca lo hicieron 20 dat. Todas las demás concentraciones nutrimentales no cambiaron en respuesta a los tratamientos probados.

Efecto de las interacciones de los factores de estudio en las concentraciones nutrimentales en planta

El análisis del efecto de la interacción de los factores PEG x VAR en las concentraciones de los macronutrientes en tejido vegetal, mostró que las diferencias fueron más evidentes 30 dat, especialmente para las concentraciones de K, Mg y S (Figura 1).

Las concentraciones de N fueron diferentes 20 y 30 dat, aunque más notorias 30 dat, de manera especial en la variedad CP 72-2086. No se observaron efectos significativos para P 20 ni 30 dat. Las concentraciones de K no fueron afectadas por los tratamientos 20 dat, aunque se redujeron significativamente

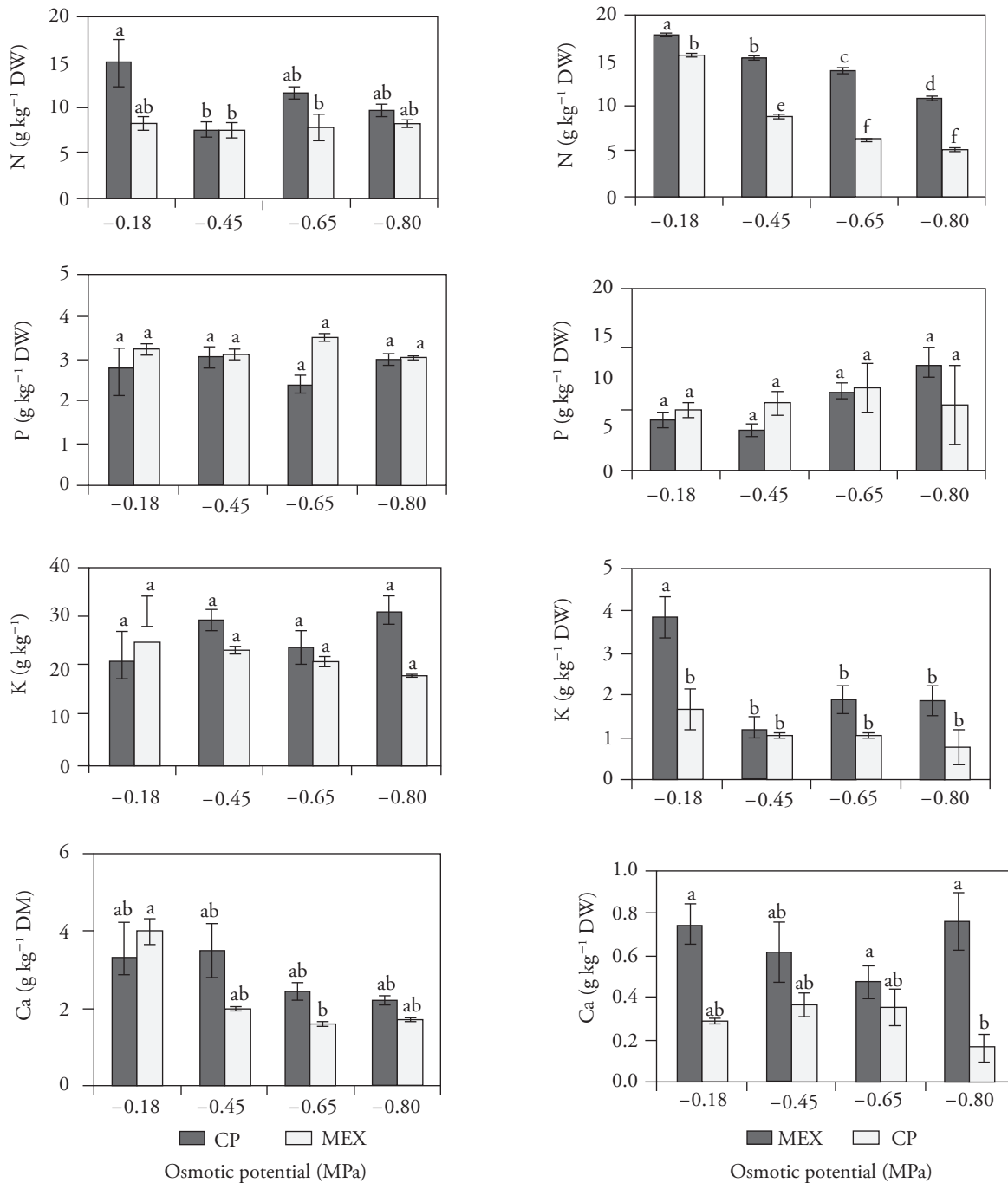


Figure 1. Effect of interaction of study factors on macronutrient concentrations in sugarcane Mex 69-290 and CP 72-2086 plants 20 dat (left side) and 30 dat (right side). Different letters in the subfigure columns indicate statistical differences among treatments ($p \leq 0.05$).

Figura 1. Efecto de la interacción de los factores de estudio en las concentraciones de macronutrientes en plantas de caña de azúcar Mex 69-290 y CP 72-2086, 20 dat (lado izquierdo) 30 dat (lado derecho). Letras distintas sobre las columnas de cada subfigura indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Figura 1. Continúa...

Figura 1. Continúa...

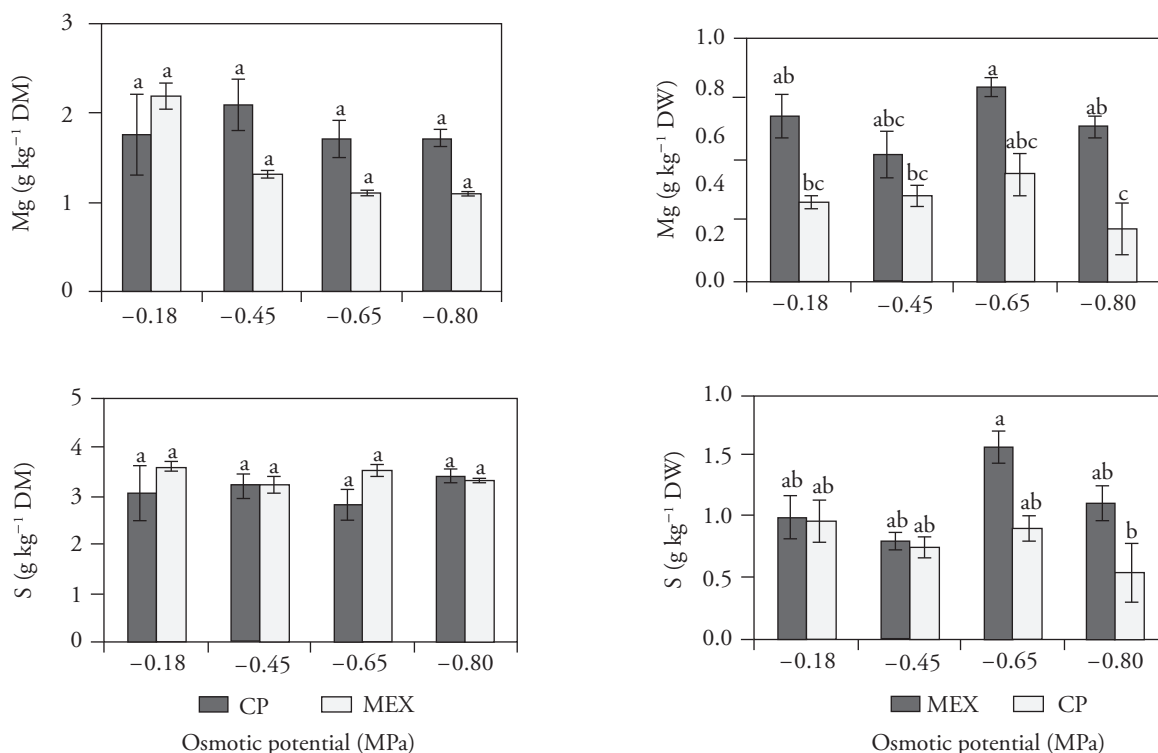


Figure 1. Effect of interaction of study factors on macronutrient concentrations in sugarcane Mex 69-290 and CP 72-2086 plants 20 dat (left side) and 30 dat (right side). Different letters in the subfigure columns indicate statistical differences among treatments ($p \leq 0.05$).

Figura 1. Efecto de la interacción de los factores de estudio en las concentraciones de macronutrientes en plantas de caña de azúcar Mex 69-290 y CP 72-2086, 20 dat (lado izquierdo) 30 dat (lado derecho). Letras distintas sobre las columnas de cada subfigura indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

increasing tolerance to drought-related stress. Such mechanisms are essential for tolerance to water stress, acting on N metabolism as well as helping to maintain or augment biomass. In our study, the MS medium contained higher concentrations of nitrate than ammonium (i.e., 39.5 mM of NO_3^- and 20.5 mM of NH_4^+) (Bensaddek *et al.*, 2001). However, sugarcane strongly prefers ammonium over nitrate (Robinson *et al.*, 2011), which could explain the lower N contents observed in our sugarcane plants (an average of 11.6 g kg⁻¹ DW) in comparison to a sufficient leaf N range reported by McCray and Mylavarapu (2013) of 20 to 26 g kg⁻¹ DW.

Calcium plays an essential role in the structural and functional integrity of plant membranes and other cellular. In drought-stressed plants there is a decrease of nearly 50 % in leaf Ca^{2+} (Lisar *et al.* 2012), whereas

30 dat. El calcio se redujo significativamente 20 dat en ambas variedades, en tanto que la variedad CP 72-2086 mostró efectos significativos de los tratamientos 30 dat. De manera similar, las concentraciones de Mg se redujeron significativamente 30 dat, y la variedad CP 72-2086 fue la más afectada. Finalmente, las concentraciones de S no cambiaron en respuesta al estrés osmótico en ninguna de las dos variedades 20 dat, aunque 30 dat si se observó una reducción de este nutriente en la variedad CP 72-2086.

De acuerdo con lo revisado, este es el primer estudio que reporta el efecto del estrés osmótico inducido por PEG en las concentraciones de macronutrientes en caña de azúcar en condiciones *in vitro*. Se destaca que las concentraciones de N y Ca fueron afectadas significativamente por los tratamientos de PEG, en las condiciones experimentales aquí

soil water shortages can decrease root hydraulic conductivity and affect Ca uptake and movement throughout the plant (Wu *et al.*, 2012). Osmotic stress induced by 10 % PEG 6000 significantly decreased cortical cell volume, and application of additional Ca^{2+} regulated the expression and activity levels of aquaporins according to water availability, which contributed to optimized water use (Wu *et al.*, 2012). Abdalla and El-Khoshiban (2007) reported reduction in calcium content in wheat plants under drought-related stress, as did Akhondi *et al.* (2006) for shoots of *Medicago sativa*, and Hu *et al.* (2007) in maize, which is consistent with our results.

Under stress conditions, one of the first responses is the transient increase in cytosolic calcium, derived from the influx of apoplastic reserve or the release from internal compartments such as the vacuole and endoplasmic reticulum, which contain higher levels of Ca than the cell cytosol (Dedemo *et al.*, 2013). Therefore, sugarcane genotypes capable of maintaining high Ca contents may display better performance under stress due to water deficit, as was the case of the Mex 69-290 variety.

Though no differences were observed among treatments for P concentrations 30 dat (Table 1; Figure 1), a drastic drop in the concentration of this macronutrient was observed when comparing it to that displayed by plants 20 dat (i.e. 3.0 g kg^{-1} P 20 dat vs. 1.1 g kg^{-1} P 30 dat). This decrease was indeed more evident in the CP 72-2086 variety (Figure 1). Jin *et al.* (2014) reported that phosphorus application and elevated CO_2 interactively enhanced periodic drought tolerance in field pea as a result of decreased stomatal conductance, deeper rooting and high phosphate availability for carbon assimilation in leaves. Phosphate is essential to photosynthetic processes and adjustments in the relationships among the leaf gas exchange network support the high drought tolerance of the sugarcane. Such adjustments enabled the homeostasis of both photosynthesis and plant growth under water deficit. Moreover, phosphate supply improves the sugarcane acclimation capacity by affecting plant characteristics related to water status and photosynthetic performance and causing network modulation under water deficit (Sato *et al.*, 2010). Hence, the relative higher level of phosphate in the Mex 69-290 variety showed a better capacity of this genotype to overcome water deficit.

Of the mineral nutrients, potassium plays a pivotal role in improving plant tolerance to water stress

probadas. El nitrógeno es un nutrimento esencial determinante para el logro de máximos rendimientos y la caña de azúcar absorbe N en cantidades más altas que cualquier otro nutrimento debido a que este elemento mineral es un componente crucial de todas las enzimas y moléculas vitales como las clorofilas y los ácidos nucleicos (McCray *et al.*, 2013). Por tanto, el N es necesario para el crecimiento, el desarrollo y la producción de cultivos. Debido a que absorción de N, producción de biomasa, rendimiento y producción de azúcar son procesos fuertemente correlacionados, los requerimientos de N por la caña de azúcar son altos, y deben estar en balance con otros nutrimentos, especialmente si las plantas están expuestas a factores de estrés como la sequía (Bäzinger *et al.*, 2000). De acuerdo con Villar-Salvador *et al.* (2013), el mantenimiento de un bajo contenido de N en plantas en condiciones de deficiencia de agua permite que éstas puedan prosperar y sobrevivir a este embate ambiental. El nitrógeno, ya sea como amonio (NH_4^+) o como nitrato (NO_3^-), tiene diferentes efectos en parámetros de intercambio de gases (Guo *et al.*, 2007). Zhang *et al.* (2011) reportaron que un mayor aporte de NO_3^- favorece respuestas antioxidantes, en comparación con una nutrición con mayor aporte de NH_4^+ , lo que estimula mecanismos de tolerancia al estrés por sequía. Tales mecanismos son esenciales para la tolerancia al déficit de agua, y actúan sobre el metabolismo del N, lo que permite mantener o aumentar la biomasa de la planta. El medio MS usado en la presente investigación contiene mayores concentraciones de nitrato que de amonio (39.5 mM de NO_3^- y 20.5 mM de NH_4^+) (Bensaddek *et al.*, 2001). Sin embargo, la caña de azúcar prefiere amonio sobre nitrato (Robinson *et al.*, 2011), lo cual puede explicar los bajos contenidos de N observados en las plantas de caña (un promedio de 11.6 g kg^{-1} del peso de la materia seca), en comparación con un abastecimiento suficiente de N reportado por McCray y Mylavarapu (2013) de 20 a 26 g kg^{-1} del peso de la materia seca.

El calcio es un elemento esencial en la integridad estructural y funcional de las membranas vegetales y de otros componentes celulares. En plantas sometidas a estrés por sequía se presenta una reducción cercana al 50 % del Ca en hoja (Lisar *et al.*, 2012), en tanto que la reducción del agua en el suelo disminuye la conductividad hidráulica de la raíz y afecta la absorción y movimiento del Ca dentro de la planta (Wu *et al.*, 2012). El estrés osmótico inducido por la

conditions. It modulates many physiological processes such as activation of enzymes, photosynthesis, maintenance of turgescence, and translocation of photosynthates (Yadov, 2006). However, water deficit may inhibit K uptake and the extent of such inhibition is genotype dependent (Kirnak *et al.*, 2001). For instance, between contrasting sugar beet varieties grown under water deficit, K increased in one, and decreased in the other (Alam, 1999). Our results demonstrate that 30 dat, both sugarcane varieties evaluated displayed a dramatic reduction of K concentration, though the decrease was more pronounced in CP 72-2086.

Under field conditions, both varieties Mex 69-290 and CP 72-2086 are drought tolerant (Salgado-García *et al.*, 2012). Nevertheless, in laboratory and greenhouse studies, the variety Mex 69-290 exhibits better performance under osmotic stress than the variety CP 72-2086 does (Castañeda-Castro *et al.*, 2014). This fact may explain, at least in part, the different behaviors displayed by these varieties under our experimental conditions.

CONCLUSIONS

Osmotic stress induced by PEG differentially affects macronutrient concentrations in sugarcane *in vitro*, with N and Ca more affected than the other nutrients studied. Furthermore, we found different responses between varieties, with Mex 69-290 plants having higher nutrient concentrations and therefore better performance under our experimental conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to the Colegio de Postgraduados Science and Technology Trust, the Priority Research Line 5 - Microbial, Plant and Animal Biotechnology and to the Universidad Veracruzana, for providing laboratory facilities and financial support for this study.

LITERATURE CITED

Abdalla, M. M., and N. H. El-Khoshiban. 2007. The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticum aestivum* cultivars. *J. Appl. Sci. Res.* 3: 2062-2074.

aplicación de 10 % de PEG 6000 disminuyó significativamente el volumen celular cortical, y la aplicación de Ca adicional reguló la expresión y actividad de acuaporinas, de acuerdo a la disponibilidad de agua, lo que contribuyó a optimizar el uso del vital líquido (Wu *et al.*, 2012). Abdalla y El-Khoshiban (2007) reportan una disminución en el contenido de Ca en plantas de trigo sometidas a estrés por sequía, lo mismo que Akhondi *et al.* (2006) para plantas de *Medicago sativa*, y Hu *et al.* (2007) en maíz, lo cual es consistente con los resultados mostrados en la presente investigación.

En condiciones de estrés, una de las primeras respuestas es el incremento transiente de Ca citosólico, derivado del influjo de reservas apoplásticas y a partir de compartimentos internos como la vacuola y el retículo endoplásmico, los cuales contienen mayores niveles de Ca que el citosol (Dedemo *et al.*, 2013). Por tanto, los genotipos de caña de azúcar capaces de mantener altos contenidos de Ca pueden tener mejor desempeño en condiciones de estrés debido a déficit hídrico, como es el caso de la variedad Mex 69-290.

A pesar de que no haber diferencias entre tratamientos respecto a las concentración de P en planta 30 dat (Cuadro 1; Figura 1), sí hubo una caída drástica en la concentración de este macronutriente al compararlo con las concentraciones 20 dat (3.0 g kg^{-1} P 20 dat vs. 1.1 g kg^{-1} P 30 dat, respectivamente). Este decremento fue más evidente en la variedad CP 72-2086 (Figura 1). Jin *et al.* (2014) reportaron que la aplicación de fósforo y de altos niveles de CO_2 , mejora la tolerancia a sequía periódica en chícharo en condiciones de campo, como consecuencia de una reducida conductancia estomática, enraizamiento más profundo y mayor disponibilidad de P_i para la asimilación de carbono en hojas.

El fósforo es esencial para la fotosíntesis y los ajustes en las relaciones entre la red de intercambio de gases en hoja explica la alta tolerancia de caña de azúcar a la sequía. Tales ajustes hacen posible la homeostasis de la fotosíntesis y el crecimiento vegetal en condiciones de deficiencia de agua. Además, el suministro de P mejora la capacidad de aclimatación de la caña de azúcar al afectar las características de la planta relacionadas con el estatus de agua y el desempeño fotosintético (Sato *et al.*, 2010). Por tanto, el alto nivel relativo de P en la variedad Mex 69-290 le confirió una mejora en la capacidad de adaptación a la deficiencia de agua.

- Akhondi M., A. Safarnejad, and M. Lahouti. 2006. Effect of drought stress on proline accumulation and mineral nutrients changes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Sci. Tech. Agr. Nat. Res. Water Soil Sci. 10: 165-175.
- Alam, S. M. 1999. Nutrient uptake by plants under stress conditions. In: Pessaraki, M. (ed). Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker. New York, USA. pp: 285-314.
- Al-Bahrany A., M. 2002. Callus growth and proline accumulation in response to polyethylene-glycol induced osmotic stress in rice *Oryza sativa*. Pakistan J. Biol. Sci. 5: 1294-1296.
- Alcántar, G. G., y M. V. Sandoval. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial. Núm. 10. SMCS. Chapingo, Texcoco, Estado de México. 150 p.
- Bäzinger, M., G. O. Edmeades, D. Beck, and M. Bellon. 2000. Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice. CIMMYT, Mexico City, Mexico. 68 p.
- Bensaddek, L., M. Gillet, J. E. Nava-Saucedo, and M. A. Fliniaux. 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. J. Biotech. 85: 35-40.
- Bremner J., M. 1965. Total nitrogen. In: Black C. A. (ed.). Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp: 1149-1178.
- Castañeda-Castro, O., L. I. Trejo-Téllez, F. C. Gómez-Merino, L. Jácome-Ortiz, H. Hernández de la Cruz, V. Morales-Ramos, M. T. González-Arno, Y. M. Martínez-Ocampo, R. Gámez-Pastrana, y M. C. Pastelín-Solano. 2014. Respuestas de las variedades Mex 69-290 y CP 72-2086 de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a la salinidad. Agroproductividad. 7: 55-59.
- Cavali, J., O. G. Pereira, S. C. V. Filho, E. M. Santos, G. G. P. de Carvalho, M. V. Santos, M. O. Porto, and J. F. H. Rodrigues. 2010. Bromatological and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with calcium oxide. Rev. Bras. Zootec. 39: 1398-1408.
- CONADESUCA. 2015. Cifras de Cierre de Superficie Cosechada, y de Producción de Caña y Azúcar, Zafra 2014/15. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. México. D.F. www.infocana.gob.mx/mos_boletin.php?id=319. (Consulta: Septiembre 2015).
- da Silva, P. P., L. Soares, J. G. da Costa, L. S. Viana, J. C. F. de Andrade, E. R. Gonçalves, J. M. dos Santos, G. V. S. Barbosa, V. X. Nascimento, A. R. Todaro, A. Riffel, M. F. Grossi de Sa, M. H. P. Barborsa, A. E. G. Sant'Ana, and C. E. Ramalho Neto. 2012. Path analysis for selection of drought tolerant sugarcane genotypes through physiological components. Ind. Crop. Prod. 37: 11-19.
- Dedemo, G. C., F. A. Rodrigues, P. G. Roberto, C. B. Neto, S. C. Franca, and S. M. Zingaretti. 2013. Osmoprotection in sugarcane under water deficit conditions. Plant Stress. 7: 1-7.
- FAO. 2015. Food and agricultural commodities production. Sugar cane production. Countries by commodities. faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity/S (Consulta: Septiembre, 2015).
- Gentile, A., L. I. Dias, R. S. Mattos, T. H. Ferreira, and M. Menossi. 2015. microRNAs and drought responses in sugarcane. Front. Plant Sci. 6. http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00058.
- De los nutrimentos minerales, el K desempeña una función determinante en el mejoramiento de la tolerancia de las plantas al estrés hídrico. Este elemento modula muchos procesos fisiológicos como activación enzimática, fotosíntesis, mantenimiento de la turgencia, y translocación de fotosintatos (Yadov, 2006). Sin embargo, la deficiencia de agua puede inhibir la absorción de K y la magnitud de tal inhibición depende del genotipo (Kirnak *et al.*, 2001). Por ejemplo, entre variedades contrastantes de remolacha azucarera crecidas en condiciones de deficiencia de agua, el K incrementó en una, y decreció en la otra (Alam, 1999). Los resultados reportados en la presente investigación muestran que 30 dat, ambas variedades de caña de azúcar evaluadas tuvieron una drástica reducción en la concentración de K, aunque esa reducción fue más pronunciada en la variedad CP 72-2086.
- En condiciones de campo, tanto la variedad Mex 69-290 como la CP 72-2086 son resistentes a la sequía (Salgado- García *et al.*, 2012). No obstante, en estudios de laboratorio y de invernadero, la variedad Mex 69-290 muestra mejor desempeño en condiciones de estrés osmótico que la variedad CP 72-2086 (Castañeda-Castro *et al.*, 2014). Este hecho puede explicar, al menos parcialmente, los diferentes comportamientos que mostraron estas dos variedades en las condiciones experimentales de la presente investigación.

CONCLUSIONES

El estrés osmótico inducido por PEG afecta diferencialmente las concentraciones de macronutrientes en caña de azúcar *in vitro*. Los elementos más afectados son N y Ca, en comparación con los demás nutrimentos estudiados. Además, se encontraron diferentes respuestas entre variedades porque la variedad Mex 69-290 mostró mayores concentraciones nutrimentales que la CP 72-2086.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

- Gómez-Merino, F. C., y H. E. Senties-Herrera. 2015. Manual para la identificación varietal de caña de azúcar. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 40 p.
- Graça, J. P., F. A. Rodrigues, J. R. B. Farias, M. C. N. Oliveira, C. B. Hoffmann-Campo, and S. M. Zingaretti. 2010. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. Brazil. J. Plant Physiol. 22: 189-197. doi: 10.1590/S1677-04202010000300006.
- Guo, S., R. Kaldenhoff, N. Uehlein, B. Sattelmacher, and H. Brück. 2007. Relationship between water and nitrogen uptake in nitrate- and ammonium-supplied *Phaseolus vulgaris* L. plants. J. Plant Nutr. Soil Sci. 170: 73-80.
- Haro, M. E., I. Navarro, R. Thompson, and B. Jimenez. 2013. Estimation of the water footprint of sugarcane in Mexico: is ethanol production an environmentally feasible fuel option? J. Water Clim. Change 5: 70-80.
- Hu, Y., Z. Burucs, S. Tucher, and U. Schmidhalter. 2007. Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. Environ. Exp. Bot. 60: 268-275.
- Inman-Bamber, N. G. 2004. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. Field Crop. Res. 89: 107-122. doi: 10.1016/j.fcr.2004.01.018.
- Jin, J., D. Lauricella, R. Armstrong, P. Sale, and C. Tang. 2014. Phosphorus application and elevated CO₂ enhance drought tolerance in field pea grown in a phosphorus-deficient vertisol. Ann. Bot. doi: 10.1093/aob/mcu209.
- Kirnak, H., C. Kaya, I. Tas, and D. Higgs. 2001. The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in eggplants. Bulg. J. Plant Physiol. 27: 34-46.
- Labanowska, M., M. Filek, M. Kurdziel, E. Bidzińska, Z. Miszalski, and H. Hartikainen. 2013. EPR spectroscopy as a tool for investigation of differences in radical status in wheat plants of various tolerances to osmotic stress induced by NaCl and PEG-treatment. J. Plant Physiol. 170: 136-145.
- Lagerwerff, J. V., G. Ogata, and H. E. Eagle. 1961. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene-glycol. Science 133: 1486-1487.
- Lisar, S. Y. S., R. Motafakkerzad, M. M. Hossain, and I. M. N. Rahman. 2012. Water stress in plants: causes, effects and responses. In: Rahman, I. M. N., Hasegawa, H. (eds). Water Stress, ISBN: 978-953-307-963-9, InTech. <http://www.intechopen.com/books/water-stress/water-stress-in-plants-causes-effects-and-responses>. (Consulta: Enero, 2015).
- Macar, T. K., O. Turan, and Y. Ekmekci. 2009. Effects of water deficit induced by PEG and NaCl on chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars and lines at early seedling stages. Gazi U. J. Sci. 22: 5-14.
- McCray J.M., and R. Mylavarapu. 2013. Sugarcane nutrient management using leaf analysis. University of Florida, IFAS Extension, SS-AGR-335. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/AG/AG34500.pdf>. (Consulta: Enero 2015).
- McCray, J. M., R. W. Rice, I. V. Ezenwa, T. A. Land, and L. Baucum. 2013. Sugarcane plant nutrient diagnosis. University of Florida, IFAS Extension, SS-AGR-128. Available at: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/SC/SC07500.pdf>. (Consulta: Enero 2015).
- Medeiros, D.B., E. C. da Silva, R. J. M. C. Nogueira, M. M. Teixeira, and M. S. Buckeridge. 2013. Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering Theor. Exp. Plant Physiol. 25: 213-222. <http://dx.doi.org/10.1590/S2197-00252013000300006>.
- Money N., P. 1989. Osmotic pressure of aqueous polyethylene-glycols. Relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. Plant Physiol. 91: 766-769.
- Moyer, M. 2010. How much is left? A graphical accounting of the limits to what one planet can provide. Sci. Am. Environ. September 2010: 74-81.
- Murashige, T., and F. A. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.
- Ribeiro, R. V., R. S. Machado, E. C. Machado, D. F. S. P. Machado, J. R. Magalhães-Filho, and M. G. A. Landell. 2013. Revealing drought-resistance and productive patterns in sugarcane genotypes by evaluating both physiological responses and stalk yield. Exp. Agric. 49: 212-224. doi: 10.1017/S0014479712001263.
- Robinson, N., R. Brackin, K. Vinall, F. Soper, J. Holst, H. Gamage, C. Paungfoo-Lonhienne, H. Rennenberg, P. Lakshmanan, and S. Schmidt. 2011. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. PLoS ONE 6: e19045. doi: 10.1371/journal.pone.0019045.
- Rodrigues, F. A., M. L. Laia, and S. M. Zingaretti. 2009. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plant. Plant Sci. 176: 286-302. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.11.007.
- Rudorff, B. F. T., D. A. de Aguiar, W. F. da Silva, L. M. Sugawara, M. Adami, and M. A. Moreira. 2010. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo State (Brazil) using Landsat data. Remote Sens. 2:1057-1076. doi:10.3390/rs2041057.
- Salgado-García, S., L. C. Lagunes-Espinoza, R. Núñez-Escobar, C. F. Ortiz-García, L. Bucio-Alanís, y E. M. Aranda-Ibáñez. 2012. Caña de Azúcar: Producción Sustentable. Colegio de Postgraduados – MundiPrensa. Texcoco, México. 552 p.
- SAS (Statistical Analysis System). 2011. SAS user's guide. Statistics. Version 9.3. SAS Inst., Cary, NC, United States.
- Sato, A. M., T. A. Catuchi, R. V. Ribeiro, and G. M. Souza. 2010. The use of network analysis to uncover homeostatic responses of a drought-tolerant sugarcane cultivar under severe water deficit and phosphorus supply. Acta Physiol. Plant. 32: 1145-1151.
- Schueneman, T. J., J. D. Miller, R. A. Gilbert, and N. L. Harrison. 2008. Sugarcane cultivar CP 72-2086 Descriptive Fact Sheet. University of Florida. IFAS Extension. SSAGR115. <http://ufdcimages.uffib.ufl.edu/IR/00/00/15/68/00001/AG13000.pdf>. (Consulta: Enero 2015).
- Senties-Herrera, H. E., F. C. Gómez-Merino, A. Valdez-Balero, H. V. Silva-Rojas, and L. I. Trejo-Téllez. 2014. The agro-industrial sugarcane system in Mexico: Current status, challenges and opportunities. J. Agr. Sci. 6: 26-54. doi: 10.5539/jas.v6n4p26.
- Singels, A., A. J. Kennedy, and C. N. Bezuidenhout. 2000. The effect of water stress on sugarcane biomass accumulation and partitioning. Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 74: 169-172.
- Smith, J. P., R. J. Lawn, and R. O. Nable. 1999. Investigations into the root:shoot relationship of sugarcane and some implications for crop productivity in the presence of sub-optimal conditions. Proc. Austr. Soc. Sugar Cane Technol. 21: 108-113.

- Tammisola, J. 2010. Towards much more efficient biofuel crops - can sugarcane pave the way? *GM Crops* 1: 181-198. doi:10.4161/gmcr.1.4.13173.
- Vargas, L., A. B. Santa Brígida, J. P. M. Filho, T. G. de Carvalho, C. A. Rojas, D. Vaneechoutte, M. Van Bel, L. Farrinelli, P. C. G. Ferreira, K. Vandepoele, and A. S. Hemery. 2014. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A transcriptomic view of hormone pathways. *PLoS ONE* 9(12): e114744. doi:10.1371/journal.pone.0114744.
- Villar-Salvador, P., J. L. Peñuelas, and D. F. Jacobs. 2013. Nitrogen nutrition and drought hardening exert opposite effects on the stress tolerance of *Pinus pinea* L. seedlings. *Tree Physiol.* 33: 221-32.
- Wu, Y., X. Liu, W. Wang, S. Zhang, and B. Xu. 2012. Calcium regulates the cell-to-cell water flow pathway in maize roots during variable water conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 212-219.
- Yadov, D. V. 2006. Potassium nutrition of sugarcane. *In*: Benbi, D. K., M. S. Brar, and S. K. Bansal (eds). *Balanced Fertilization for Sustaining Crop Productivity*. International Potash Institute. Horgen, Switzerland. pp: 275-288.
- Zhang, L., K. Wang, X. Zhang, L. Lu, Y. Li, M. Gao, C. Wang, J. Hu, and Z. Liang. 2011. Role of nitrate nutrition in alleviation of the adverse effects of drought stress on maize cultivars: biomass production and antioxidative capacity. *Pakistan J. Bot.* 43: 2869-2874.