

En el laboratorio del autor, el escaso enraizamiento es más frecuente en las plantas provenientes de la micropropagación. Se han investigado medios de cultivo que aseguren el enraizamiento y una alta supervivencia de los plantines en la fase de campo.

Para inducir el enraizamiento de las plantas provenientes del cultivo de tejidos, se ensayaron combinaciones (en diferente concentración) de sales minerales, sacarosa y carbón activado; también se ensayó la presencia o ausencia de agua de coco. Los mejores resultados se obtuvieron con los dos tratamientos siguientes:

- a. El medio de regeneración de Heinz y Mee (1969) a la mitad de su concentración + carbón activado (5 g/litro) + 9% (p/v) de sacarosa.
- b. Totalidad de la concentración de las sales minerales del medio MS (1962) más 4% de sacarosa (sin agua de coco).

Un alto contenido de sacarosa en los medios de cultivo provoca un bajo porcentaje de supervivencia in vitro, a causa probablemente del elevado valor osmótico de estos medios. Para la inducción del enraizamiento in vitro en plantas de 3 a 5 cm de altura se recomiendan siempre contenidos de sacarosa de 4% a 5% (p/v). Cuando no se agrega agua de coco, se obtiene un mejor desarrollo radicular y mayor longitud de las raíces de las plántulas. Marezki y Hisaki (1980) proponen un medio que contenga de 7% a 9% de sacarosa y la mitad de la concentración de las sales de MS.

La inducción del enraizamiento en las plantas provenientes de la micropropagación es más difícil a causa de las altas concentraciones de citocinina (en especial, de 6-bencilaminopurina) que se agregan a esos medios de cultivo para provocar el ahijamiento. Antes de pasar estas plantas a un medio de enraizamiento, deben separarse bien los tallos individuales, y se les deben retirar los tejidos necrosados de consistencia dura y coloración oscura que se les acumulen alrededor del cuello durante al fase de ahijamiento.

Se ensayaron entonces medios de cultivo basados en la totalidad de la concentración de las sales minerales propuestas por Murashige y Skoog (1962) y con diferentes concentraciones y combinaciones de los siguientes componentes:

- Hormonas: ácido 3-indolacético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), y ácido giberélico (GA₃)
- Vitaminas: ácido nicotínico, piridoxina (Vit. B6), tiamina (Vit. B1), glicina, ácido L-ascórbico y mioinositol.

- Aminoácidos: arginina.
- Sacarosa (principal fuente de carbohidratos).
- Agua de coco.

Los resultados indicaron que para inducir el enraizamiento en las plantas de caña de azúcar provenientes de la micropropagación debe emplearse uno de los siguientes medios de cultivo:

Medio A: Sales minerales de MS (concentración total) + ácido nicotínico (4 mg/litro) + piridoxina o Vit. B6 (2.5 mg/litro) + tiamina o Vit. B1 (3 mg/litro) + glicina (2.5 mg/litro) + AIA (7.4 mg/litro) + 6% (p/v) de sacarosa.

Medio B: Sales minerales de MS (concentración total) + AIA (7.4 mg/litro) + 6% (p/v) de sacarosa.

En la Figura 25.6 se aprecian las diferencias que presentan las plántulas desarrolladas en cuatro de los medios probados, 4 semanas después de ser pasadas a dichos medios. Las plantas marcadas I y III en la foto proceden de los medio A y B, respectivamente.



Figura 25.6. Influencia de cuatro medios de cultivo en el enraizamiento de plántulas de caña de azúcar obtenidas por micropropagación.

En estos dos medios de cultivo se obtuvieron plantas con raíces abundantes y de gran longitud; las plantas adquirirían además gran altura y vigor, su mortalidad *in vitro* era nula y dieron porcentajes de supervivencia muy altos en el trasplante a tierra. Además, estos medios garantizaban de cinco a seis hijos por cada planta pasada a ellos, en un período de 4 semanas; este hecho tiene gran importancia, ya que esas plantas provenían de la micropropagación y, por ello, aumenta aún más el número de plantas aptas para ser pasadas a tierra.

Suspensiones Celulares

El primer informe de la regeneración de plantas a partir de suspensiones fue hecho por Heinz y Mee (1971). Para establecer suspensiones deben emplearse callos friables, es decir, altamente morfogénicos; Liu (1983) recomienda que sean del quinto al séptimo pase. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Seleccionar callos friables de los pases 3 y 4.
- 2) Inocular de 1 a 3 g de callos en 50 ml del medio MS suplementado con 500 mg/litro de caseína hidrolizada, 3 mg/litro de 2,4-D, 10% de agua de coco y 20 g/litro de sacarosa, en un Erlenmeyer de 250 ml.
- 3) Agitar aplicando de 120 a 150 rpm.
- 4) Cada 3 días, decantar la parte superior (que se desecha) y añadir la misma cantidad de medio eliminado.
- 5) Cuando predominen las células meristemáticas aisladas, filtrar en malla de 150 a 300 μm de diámetro.
- 6) Centrifugar a 100g de 5 a 10 minutos.
- 7) Tomar el precipitado y emplearlo para plaquear o para hacer un nuevo subcultivo.

Hay diversos medios de cultivo para obtener la desagregación de suspensiones celulares (Liu, 1983; Wai y Vasil, 1983; Martínez et al., 1984). Los resultados obtenidos en el laboratorio de la Universidad Central de Las Villas muestran que el agua de coco y la caseína hidrolizada son importantes. Combinando ambos elementos se han podido establecer suspensiones en un tiempo de 12 a 15 días.

Las suspensiones celulares están compuestas básicamente por dos tipos de células. Las embriogénicas son pequeñas, de abundante citoplasma, se

dividen activamente, y su núcleo es prominente. Estas células se presentan aisladas o formando un núcleo meristemático de hasta 50 células; su grado de disociación depende del genotipo. Las otras células que predominan son las parenquimatosas, que son largas, vacuoladas, a menudo elongadas, y con citoplasma tenue. Al iniciarse el trabajo, aparecen también en las suspensiones las células gigantes: éstas y las parenquimatosas se eliminan por decantación, paso que se hará según las células que predominen en la suspensión. En la Figura 25.7 aparecen los tres tipos de células que se presentan en una suspensión.

Se estableció una suspensión y se subcultivó. Se encontró entonces que, en todas las variedades estudiadas, aumentaba rápidamente el número de células a partir del día 4, el día 8 alcanzaba el máximo crecimiento, y después descendía bruscamente. Estos resultados indican que los subcultivos no deben durar más de 8 días. Iguales resultados fueron hallados por Liu (1983).

Para evaluar la vitalidad de las células, el azul de Evans al 5% resultó efectivo porque penetra en las células muertas; éstas pueden llegar hasta el 20% del total de células en una suspensión. Este método empleado por Graft en 1971, fue aplicado por Thorpe (1981) y Martínez et al. (1984).

La duración de estas suspensiones llega a 2 años (Wai y Vasil, 1983) sin que pierdan su capacidad de regeneración, y se ha comunicado el mantenimiento de suspensiones durante 6 años. Martínez et al. (1984) encontraron que las células perdían rápidamente la capacidad de regenerar plantas, aunque se conocen suspensiones de caña de azúcar de 32 meses que no perdieron esa capacidad.

Más difícil que la obtención de las suspensiones es la regeneración de plantas a partir de aquéllas. En esta etapa, la composición del medio es muy importante. El medio MS suplementado con 500 mg/litro de caseína hidrolizada, 10% de agua de coco, y 1 mg/litro de 2,4-D resultó adecuado para la formación de callos friables y altamente regenerativos. Mayor información sobre la técnica de las suspensiones aparece en Thom et al. (1981), Wai y Vasil (1983), Liu (1983) y Cougall (1980).

Cultivo de Anteras

Varios investigadores han estudiado el cultivo de anteras en la caña de azúcar, pero sólo Maureen y Moore (1983) obtuvieron plantas haploides partiendo de anteras inmaduras de ocho clones y de tres híbridos, que

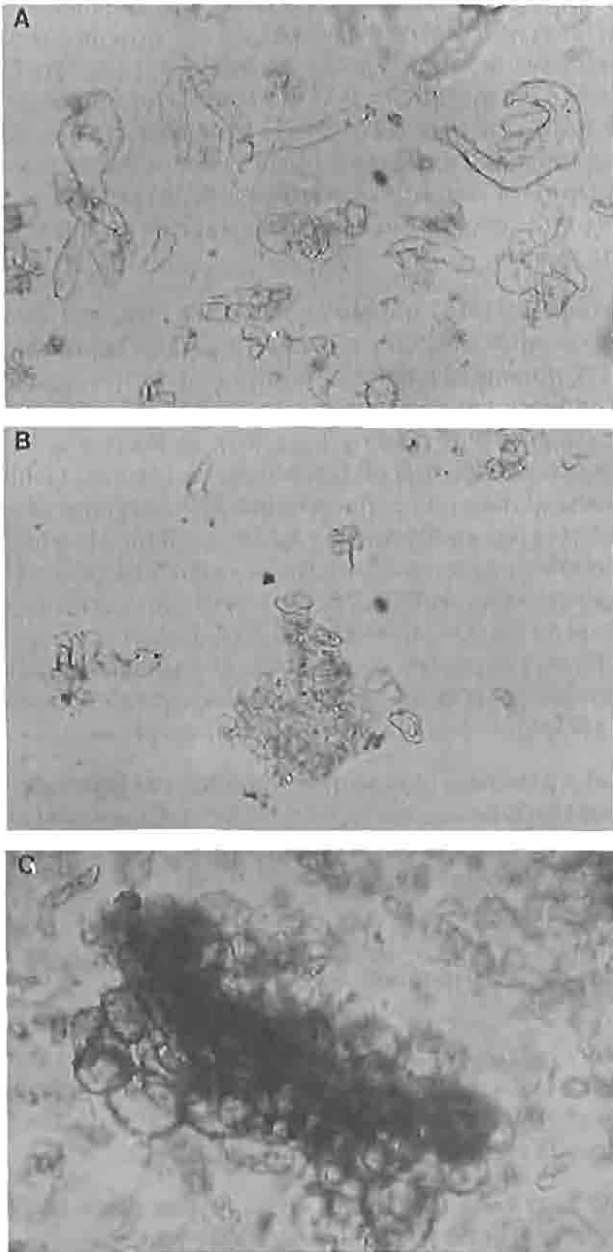


Figura 25.7. Tres tipos de células que ocurren en una suspensión celular de caña de azúcar. A) células parenquimatosas; B) células meristemáticas; C) células gigantes que aparecen, formando agregados, al inicio de la suspensión.

incubaron durante 21 días. Emplearon el medio MS variando la sacarosa de 30 a 90 g/litro con 2 mg/litro de 2,4-D y 5 mg/litro de cinetina; otro medio empleado fue MS más 30 g/litro de sacarosa, 1 mg/litro de 2,4-D, 1 mg/litro de AIA, y 1 mg/litro de BAP. La temperatura de incubación fue de 27 °C. De los 7 a los 14 días las anteras se colocaron sobre callos que tenían de 2 a 4 semanas. Para la regeneración se empleó el medio de Heinz et al. (1977). De los 11 materiales ensayados sólo dos produjeron plantas, una haploide y otra diploide. Los autores concluyeron que fue beneficioso el tratamiento térmico.

Maud y Maureen (1984) trabajaron con cinco clones de *Saccharum spontaneum*; cortaron los tallos a los pocos días de la floración y los colocaron a 4 °C durante 58 horas. Los segmentos de inflorescencia de 5 cm de largo, previamente desinfectados, se colocaron en un medio MS con 6% de sacarosa, 1 mg/litro de 2,4-D y 1 mg/litro de BAP, y se incubaron durante 3 semanas en la oscuridad. Los autores evaluaron la viabilidad de las anteras mediante diacetato de fluoresceína. En los estudios de medio de cultivo, los mejores fueron el medio N y el MS, este último con todas o con la mitad de las sales, respectivamente. Hallaron también que se incrementaban las microsporas formadoras de callo si se eliminaban las no viables y se reducían en el medio la sacarosa y el NH_4NO_3 . Concluyeron que para el cultivo de anteras se requerían, durante todo el proceso, medios y condiciones ambientales distintas, así como manipulaciones apropiadas. De los cinco clones ensayados, sólo tres produjeron microsporas.

Los resultados obtenidos indican que en el cultivo de anteras de caña de azúcar se deben controlar muchos factores, como el genotipo de las plantas donantes, pero que esta técnica podrá emplearse pronto en el mejoramiento genético de la caña.

Cultivo de Protoplastos

Los protoplastos tendrán, en la caña y en otros cultivos, gran importancia en el futuro por las ventajas que ofrecen. Rysenka y Bauer (1984) informaron que de 1 g de hojas se pueden obtener alrededor de 1 millón de protoplastos que se cultivan en 2 a 5 ml de medio de cultivo.

La floración de la caña de azúcar es un inconveniente para su producción; ahora bien, la fusión de protoplastos de genotipos que no florecen, y cuyo número de cromosomas sea compatible, es una alternativa para la obtención de genotipos que posean buenas características y que además no florezcan.

Liu (1983) describe ampliamente las técnicas empleadas para la obtención de protoplastos de caña, tanto de hojas como de suspensiones celulares. Como en otros cultivos, esas técnicas son fáciles, y el problema principal es la obtención de plantas a partir de los protoplastos (Vasil et al., 1986); estos autores emplearon suspensiones celulares, provenientes de callos altamente embriogénicos obtenidos de secciones de hojas jóvenes, como fuente de protoplastos.

Los protoplastos aislados de la suspensión se desarrollaron en el medio modificado de Kao y Michayluk con 2,4-D, benciladenina, caseína hidrolizada y agua de coco. Los embriones somáticos se formaron cuando las colonias se transfirieron al medio MS que contenía 2,4-D y carbón activado. Para la germinación de los embriones emplearon el medio MS suplementado con benciladenina y fluoridone. Con este procedimiento obtuvieron plantas que se desarrollaron hasta la madurez en el suelo.

Selección en Poblaciones Obtenidas de Callos o Suspensiones

La selección hecha en las plantas originadas de los plantines no es muy segura; por ello, en esa etapa sólo se selecciona respecto a caracteres de resistencia y al grado Brix, y se eliminan las plantas que se aparten mucho del tipo original; éste debe plantarse intercalado entre la población. En la segunda generación (primera clonal) se hace una mejor evaluación de los caracteres agroindustriales; también se puede hacer en el retoño de los plantines.

Una vez seleccionados los subclones según el carácter que se desee mejorar, el paso siguiente es plantar experimentos repetidos de la variedad original para evaluar con más precisión la planta y su primer retoño.

Si se hace la selección *in vitro* respecto a resistencia o tolerancia a los factores ambientales o a los patógenos, se hace luego la micropropagación *in vitro* de las plantas seleccionadas; de este modo es más eficiente la selección desde las primeras etapas y se hace en corto tiempo. Un esquema óptimo de trabajo sería: selección *in vitro* en las suspensiones celulares, micropropagación de las plantas seleccionadas, evaluación y selección en las plantas micropropagadas.

Obtención de Subclones Promisorios

Una vez resuelto el problema de la variabilidad, hay que aprovechar las grandes ventajas que ofrece el cultivo in vitro haciendo en él la selección. En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para dominar y perfeccionar las técnicas del cultivo in vitro, y ya se conocen 50 variedades resistentes obtenidas por ese método. Los resultados obtenidos en caña de azúcar son los siguientes.

Resistencia a enfermedades

Krishnamurthi (1974) fue el primero en comunicar la obtención de plantas resistentes a las enfermedades empleando los métodos del cultivo de tejidos. Desde 1970 se evaluaron somaclones obtenidos de diferentes variedades susceptibles a la enfermedad de Fiji (un virus transmitido por un saltahoja) y al añublo blanco ('downy mildew') causado por *Sclerospora sacchari* Miyake). Partiendo de 300 somaclones de variedades susceptibles al Fiji, cuatro fueron resistentes y uno fue intermedio, mientras que para el añublo blanco varios somaclones fueron más resistentes que la variedad original (Krishnamurthi y Tlaskal, 1974).

Larkin y Scowcroft (1981) probaron somaclones obtenidos de variedades susceptibles a la enfermedad mancha de ojo (*Helminthosporium sacchari*) y encontraron que un 8.9% de ellos presentaban alta resistencia. Chen et al. (1978) hallaron una reducción notable de la susceptibilidad al carbón de la caña causado por *Ustilago scitaminea* Syd. en un somaclón obtenido del cultivar F177, el cual es altamente susceptible a esa enfermedad.

A partir de una población inicial de 800 somaclones, obtenida de la variedad B-4362 que es altamente susceptible a la roya (*Puccinia melanocephala*), se logró un somaclón con alta resistencia a esta enfermedad derivado de callos tratados con el agente mutagénico NaN_3 . Esta resistencia se ha mantenido durante tres generaciones. Por otra parte, varios somaclones de una variedad susceptible al carbón, obtenidos de callos irradiados con ^{60}Co en dosis de 3000 rad, han manifestado muy bajo índice de infección durante dos generaciones después de su inoculación por el método de inmersión.

Otra aplicación reciente de estas técnicas es la selección in vitro mediante el empleo de toxinas aisladas y purificadas hasta toxinas crudas (medios derivados) producidas por los hongos fitopatógenos.

Chen et al. (1978) cultivaron explantes de variedades resistentes y susceptibles al añublo blanco (*Sclerospora sacchari*), conjuntamente con el hongo. Al cabo de 3 semanas notaron abundante crecimiento del hongo sobre los callos formados de variedades susceptibles y resistentes, una indicación de que la resistencia a este hongo no se expresaba a este nivel.

Maribona et al. (1985) aplicaron al medio de cultivo la toxina aislada de *Helminthosporium sacchari* y encontraron que la resistencia a esta enfermedad se expresaba en todos los niveles de organización in vitro. Varios somaclones con niveles de resistencia superiores a la variedad original fueron seleccionados en condiciones de infección natural (Maribona et al. 1986).

Callos de variedades susceptibles y resistentes al carbón de la caña (*U. scitaminea* Syd.) fueron cultivados durante 4 semanas sobre el medio de Payan y Tarcon (1977) que contenía concentraciones de 50%, 65% y 80% de medios derivados y filtrados del hongo. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las variedades resistentes y susceptibles (Cuadro 25.8) cuando los callos crecieron en el medio que contenía sustancias derivadas del medio en que se cultivó el hongo; no hubo, en cambio, significancia en el medio de Payan y Tarcon simple (Orellana y Pérez Ponce, 1987).

Sin embargo, Pérez y Chagardiet (1983) encontraron que los cultivos asociados con *U. scitaminea* experimentaron una disminución en el peso fresco tanto en las variedades susceptibles como en las resistentes; no obstante, no parece existir una relación entre el fenómeno in vitro y la respuesta de la planta al hongo.

Tolerancia a condiciones ambientales adversas

La sequía afecta seriamente la caña de azúcar causando no sólo disminución en su rendimiento sino también en la calidad de los jugos. En Cuba, el riego tiene limitaciones como las siguientes: escasez de agua para riego por la baja calidad de ésta, costo de los sistemas de riego, altos precios de los combustibles. A ellas se unen los bajos precios del azúcar en el mercado mundial. Para contrarrestar esas limitaciones, se recomienda plantar variedades tolerantes a la sequía en regiones donde el regadío sea económicamente desfavorable.

Algunos países han seleccionado variedades de caña de azúcar tolerantes a la sequía empleando métodos variados, tanto en condiciones de campo como en condiciones controladas. En los últimos años, el cultivo in vitro se ha convertido en un método promisorio para mejorar la tolerancia

Cuadro 25.8. Peso fresco de los callos de variedades (V1 a V4) de caña de azúcar en diferentes medios de cultivo.

Variedad ^a	Peso (g) en el medio: ^b											
	T			T1			T2			T3		
	md	ma	sign.	md	ma	sign.	md	ma	sign.	md.	ma	sign.
V1	0.2174	0.1688	ns	0.2578	0.1969	ns	0.2213	0.2213	ns	0.0780	0.1365	ns
V2	0.2912	0.3436	ns.	0.4332	0.5044	ns	0.6119	0.6605	ns	0.39	0.56	ns
V3	0.3207	0.3719	ns	0.0506	0.7728	++	0.0943	0.5413	++	0.1910	0.6343	++
V4	0.6448	0.6326	ns	0.4947	1.2200	+	0.6192	1.3148	+	0.8870	1.4559	+

a. V1 = My-5514 (R); V2 = B-4362 (R); V3 = B-4231 (As); V4 = My-5450 (As).

b. T = Medio normal de crecimiento de Payan y Tarcon (1977). T1 = Medio normal + 50% de sustancias derivadas (md) o de asparagina (ma). T2 = Medio normal + 65% de sustancias derivadas (md) o de asparagina (ma). T3 = Medio normal + 80% de sustancias derivadas (md) o de asparagina (ma). sign. = Significancia (ANOVA, $p = 0.05$).

a la sequía, aunque en varios cultivos sus resultados prácticos no han sido apreciables. El autor comprobó en su laboratorio la existencia de diferencias varietales en la caña de azúcar, a nivel de callos y plántulas, manifestadas en su respuesta a medios con altas concentraciones de manitol.

Estas investigaciones básicas orientan un programa de mejoramiento en el que se emplea el cultivo *in vitro* de dos maneras:

- Producción de un elevado número de plantines regenerados a partir de callos, en los cuales la variabilidad somaclonal ha sido reforzada por mutagénicos físicos, para estudiar su comportamiento en condiciones de campo y sin riego.
- Selección de callos y plántulas que crecen en medios de cultivo con concentraciones elevadas de manitol —un método de simular la sequía *in vitro*— y su posterior estudio en condiciones de campo.

Se ha observado en estos experimentos una notable variabilidad, tanto *in vitro* como en condiciones de campo, y se está corroborando ya la repetibilidad de estos resultados.

Se han publicado resultados sobre los mecanismos de tolerancia a la salinidad en callos y suspensiones, manifestados a nivel celular (Maribona et al., 1986; Kresovich et al., 1986). Hasta el presente no hay ningún resultado de interés práctico que mejore la tolerancia de la caña a condiciones ambientales adversas.

Caracteres Agroazucareros

El cultivo de tejidos ha contribuido a mejorar dos caracteres de importancia económica en la caña de azúcar: el rendimiento de caña y el de azúcar (Cuadro 25.1). Se informa de subclones, obtenidos por cultivos de tejidos, con 32% y 34% de aumento en caña y en azúcar (Liu et al., 1983).

De los componentes del rendimiento, el número de tallos ha sido el más incrementado en estos trabajos. Los resultados obtenidos en el laboratorio de la Universidad de las Villas muestran que, en los caracteres del rendimiento agrícola, se produce suficiente variabilidad para la selección; hay subclones de la variedad CP 5243, por ejemplo, en que los incrementos de rendimiento agrícola y de azúcar son 10% y 20%, respectivamente. Este comportamiento es una consecuencia de la disminución o eliminación de

la floración en esta variedad. Se han seleccionado también subclones de mayor peso de tallo, que han mantenido este carácter.

En el subclon de la variedad B-4362, resistente a la roya, aumentó la altura y el número de tallos, pero disminuyó el grosor y el contenido de azúcar.

El cultivo in vitro ha servido, en conclusión, para el mejoramiento de los caracteres agroazucareros de la caña, aunque muchas veces el incremento de los rendimientos se debe al efecto positivo producido por la eliminación de algún defecto, de la floración, o de la susceptibilidad a un factor biótico.

Conclusiones

La producción de callos, la selección a nivel de los somaclones, la selección in vitro y las suspensiones celulares: estos métodos de cultivo de tejidos permitirán obtener grandes resultados en el mejoramiento de la caña de azúcar. Las técnicas son factibles; ya se domina la suspensión celular, y se ha manifestado, a nivel celular, resistencia a importantes patógenos y tolerancia a condiciones ambientales adversas de esta especie azucarera.

En el futuro, con los protoplastos se podrá hacer directamente selección, fusión de ellos mismos, y trabajos de ingeniería genética. Se estudian, finalmente, los mutágenos, en combinación con cualquier cultivo in vitro, para aumentar la variabilidad.

El desarrollo actual de las técnicas del cultivo in vitro permite eliminar uno o dos defectos de una variedad o clon de buen comportamiento; no obstante, estas técnicas no suplementarán totalmente los métodos tradicionales del mejoramiento por cruzamiento.

Referencias

- Aholoowalia, B. S. 1983. Spectrum of variation in somaclones of triploid rye. *Grass Crop Science* 3(6):1141-1147.
- Alfonso, A. y Capote, A. 1980. Cultivo de tejidos en caña de azúcar: Obtención posterior a la regeneración de plantas in vitro. *Ciencias de la Agricultura (Academia de Ciencias de Cuba)* 6:29-32.
- Artschwager, E. 1925. Anatomy of the vegetative organs of sugarcane. *J. Agric. Res.* 30:197-221.

- Byliss, M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissue culture. En: Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press. 253 p.
- Coleman, R. E. 1970. New plants produced from tissue culture. Sugarcane Res. A.R.S. USDA 38.
- Concepción, M.; Pérez Ponce, J. y Portal, R. 1985. Comparación de distintos medios de cultivo: Noveno Seminario Científico CENIC, Habana, Cuba. (Resumen).
- Cruz Pérez, M. 1986. Conteo cromosómico en subcultivos R2, R4, R6 y R8 de la variedad C-8751 de caña de azúcar. En: Quinta Conferencia Agropecuaria y Segundo Simposio Internacional de Sanidad Vegetal, Universidad Central de Las Villas (UCLV), Cuba.
- Chen, W. H.; Liu, M. C. y Chao, M. C. 1978. The growth of sugarcane Downy Mildew fungus in tissue culture. Fourth International Congress of Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá. (Resúmenes).
- Chen, Z. H.; Qian, C. F.; Qin, M.; Wang, C. H.; Sui, C. J.; Chen, F. Z. y Deng, S. I. 1979. The conduction of pollen plants of sugarcane. En: Annual report of the Institute of Genetics. Academia Sinica, Beijing, China. p. 91-93.
- Cougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. En: Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.
- Evans, D. A.; Crocomo, D. J. y Carvalho, M. T. V. 1980. Protoplast isolation and subsequent callus regeneration in sugarcane. Z. Pflanzenphysiol. 97:335-358.
- Feldemann, P. 1984. Analyse du polymorphisme enzymatique de la canne à sucre (*Saccharum* spp.): Utilization pour la recherche de variabilité après culture *in vitro*. Tesis (Doc.). Université Paris, Sud Orsay, Francia. 145 p.
- Frías de Fernández, A. M.; Horacio, J. A. y de Canelada, L. 1975. Estudios sobre variabilidad genética de isoperoxidasas y caracteres morfológicos en subclones de caña de azúcar, obtenidos mediante cultivo de tejido *in vitro*. Rev. Agron. (Argentina) 12(1-2):97-87.
- Gamborg, O. L. y Shyluk, J. P. 1981. Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue culture. En: Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. 379 p.
- Heinz, D. J. y Mee, G. W. P. 1968. Tissue callus differentiation and regeneration of plants in *Saccharum* spp. Agron. Abstr. p. 10.
- y ———. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop. Sci 9:346-348.
- y ———. 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. Amer. J. Bot. 58(3):257-261.

- ; Krishnamurthi, M.; Nickell, L. G. y Maretzki, A. 1977. Cell tissue and organ culture in sugarcane improvement. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). *Applicated and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, Berlín. p. 3-17.
- Irvine, J. E. 1984. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 3(3):201-209.
- Kresovich, S.; McGea, R. E. y Wadsworth, S. J. 1985. Comparison of the in vitro responsiveness of callus cultures derived from immature inflorescence and leaf base tissue of two interspecific hybrids of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Sugarcane* 6:8-10.
- ; Drave, H. J. y Rivera, J. L. 1986. Variability of agronomic characters in populations of tissue culture derived and vegetatively propagated sugarcane. *Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia*. p. 528-532.
- ; Wadsworth, S. J.; Molina, J. J. y McGee, R. E. 1986. Salinity tolerance of interspecific hybrids of *Sccharum* spp.: Range and mechanisms of adaptation exhibited in cellular suspensions of commercial cultivars. En: *Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia*. p. 245-254.
- Krishnamurthi, M. 1974. Notes on disease resistance of tissue culture subclones and fusion of sugarcane protoplasts. *Sugarcane Breed Newsl. (ISSCT)* 35:24-24.
- y Tlaskal, J. 1974. Fidji disease resistance of *Saccharum officinarum* var. Pinder subclones form tissue cultures. En: *Proceedings of the 15th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Africa del Sur*. p. 130-137.
- Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Eyespot disease of sugarcane: Heat-specific toxin induction and its interaction with leaf cells. *Plant. Physiol.* 67:408-414.
- Lat, J. B. y Lantin, M. M. 1976. Agronomic performance of sugarcane clones derived from callus tissue. *Philipp. J. Crop. Sci.* 1:117-123.
- Leopold, C. A. 1963. Auxins and plant growth. *Colección Ciencia y Técnica. Instituto del Libro, La Habana, Cuba.* 354 p.
- Lee, T. S. G. 1986. Producing healthy sugarcane (*Saccharum* spp.) seedstalks by the tissue culture method. *Sixth International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture*, agosto 1986. (Resúmenes). Minneapolis, Minnesota, E.U.
- Liu, M. C. 1971. A new method for sugarcane breeding: Tissue culture technique. *Taiwan Sugar* 18(1):8-10.
- . 1981. In vitro methods applied to sugarcane improvements. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Method and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 299-323.

- . 1983. Sugarcane. En: Handbook of plant cell culture.
- ; Yeh, H. S. y Chen, W. C. 1983. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. IV: The high-sucrose and vigorously growing cell clone 71-4829. Repl. Taiwan Sugar Research. Int. 102:1-12.
- Lyrene, P. M. 1976. Tissue culture and mutations in sugarcane. Sugarcane Breed. Newsl. (ISSCT). 28:61-62.
- Mendre, R. R.; Iyer, R. S. y Kotwal, M. 1983. Rapid multiplication of sugarcane. p. 5-8.
- Maribona, R. H.; Korneva, S.; Ruiz, A. y González, S. 1983. Obtención de plantas de caña de azúcar mediante el cultivo de tejidos a partir de diferentes órganos de la planta. En: Proceedings of the 18th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Cuba. p. 55-74.
- ; Ramos, L. M. y Ruiz, A. 1985. Expresión in vitro de la resistencia a la toxina de *Helminthosporium sacchari*: Noveno Seminario Científico CENIC, Ciudad de la Habana, octubre 1985. (Resumen).
- ; Korneva, S.; Ramos, L. M. y Ruiz, A. 1986. In vitro selection of sugarcane. En: Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia. p. 533-543.
- Martínez, J. M.; Rodríguez, J. B. y Keuni, J. B. 1984. Comportamiento de la línea celular C-33 de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en condiciones de cultivo de suspensiones y de siembra en placas: Tercera Jornada Científica, La Habana, Cuba. (Resúmenes).
- Maretziki, A. y Nickell, L. G. 1973. Formation of protoplasts from sugarcane cell suspensions and the regeneration of cell culture from protoplasts. En: Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales. Colloq. Int. C.N.R.S. 212:51-63.
- y Hisaki, P. 1980. Sucrose promotion of root formation on plantlets regeneration from callus of *Saccharum* spp. Int. J. Bot. 38(1):85-88.
- Maud, A. W.; Hinchee, M. y Maureen, M. F. 1984. Culture of isolated micropores of *Saccharum spontaneum*. Z. Pflanzenphysiol. 113:305-314.
- Maureen, M. F. y Moore, P. H. 1983. Haploid production from anther culture of *Saccharum spontaneum* L. Z. Pflanzenphysiol. 109:197-206.
- Micke, A. 1981. Mejoramiento de las plantas mediante mutaciones inducidas. OIEA Boletín 23(3):50-51.
- Müller, J. O. 1985. Variation in tissue culture subclones of sugarcane. Sugar Cane 1:11-16.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:437-497.

- Nasai, C. y Schnell, R. J. 1986. Comparison of F₂ population and somaclones derived from a hybrid of *Saccharum* x *Erianthus* (*Repidium*). Sixth International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture, agosto 1986. Minneápolis, Minnesota, E.U.
- Nickell, L. G. 1964. Tissue and cell culture of sugarcane: Another research tool. *Hawaii Plant. Rec.* 57:223-229.
- y Maretzki, A. 1969. Growth of suspension culture of sugarcane in chemically obtained media. *Physiol. Plant.* 22:117-125.
- Ortiz, Q. y Quesada, R. 1982. Culture de tissus somatiques chez *Saccharum*: Analyse de la variabilité enzymatique des plantes regenerées. Tesis (Doct.). Développement et amélioration des végétaux, Université Paris, Sud Orsay, Francia. 136 p.
- Payan, F. C. y Tarcon, G. 1977. Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar mediante el cultivo de tejido y de yemas axilares. *Acta Agronómica* 27(1/4).
- Pérez Ponce, J.; Castillo, M. A.; González, M. A. y Velazco, O. 1984. Comportamiento de poblaciones obtenidas por cultivo de tejido en caña de azúcar (*Saccharum* spp.): Primer Congreso Nacional de Genética, julio 1984, La Habana, Cuba. (Resúmenes).
- y Jiménez, E. 1986. Micropropagación in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Tesis. Universidad Central de las Villas (UCLV), Cuba. 50 p.
- y Chagrardiet, P. 1983. Toxic effects between *Ustilago scitaminea* Syd. and sugar callus: In vitro effects of two growth factors. *Agronomie* 3(7):629-634.
- Price, S. 1962. A modified leaf-squash technique for counting chromos in somatic cells of *Saccharum* and related grasses. En: Proceedings of the 12th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Puerto Rico. p. 583-585.
- Ruiz, A.; Maribona, R. H.; Korneva, S.; Ramos, L. M.; Izquierdo, R. y Héctor, E. 1986. Biochemical markers for sugarcane selection. En: Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia. p. 273-283.
- Rysohka, V. y Baver, R. 1984. Perspektiven für die Nutzung der Cell und Protoplastenkultur in the Pflanzenzuchtung. *Gaterbau* 31:12-13.
- Sauvaire, D. y Galzy, R. 1983. Une method de planification expérimentale appliquée aux cultures de tissus végétaux: Exemple de la canne a sucre (*Saccharum* spp.). *Can. J. Bot.* 58:264-269.
- y ———. 1981. Micropropagation de la canne a sucre par bouturage in vitro: Action d'une auxine et d'une citokinine. *Agronomie Tropicale* 36(1): 63-69.

- Thom, M. y Maretzki, A. 1970. Peroxidase and esterase isozymes in Hawaiian sugar cane. *Hawaii Plant. Rec.* 58:81-94.
- , Maretzki, A.; Komor, E. y Sakai, S. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 1(1): 3-14.
- Thorpe, T. A. (ed.). 1981. *Plant tissue culture methods and applications in agriculture.* Academic Press, Nueva York.
- Vasil, J. K.; Srinivasan, C. y Vasil, K. 1986. Culture of protoplasts isolated from embryogenic cell suspension cultures of sugarcane and maize. Sixth International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture, agosto 1986. Minneápolis, Minnesota, E.U. (Resúmenes).
- Wai, J. H. y Vasil, I. K. 1983. Somatic embriogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot.* 51:719-726.
- Wersuhn, G. y Fritze, G. 1985. A new procedure for the in vitro culture of plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 180(1):79-83.
- White, P. R. 1963. *The cultivation of animal and plant cells.* The Ronald Press, Nueva York.
- Yeoman, M. M. y Forsche, E. 1980. Cell proliferation and growth in callus culture. En: *Perspectives in plant cell and tissue culture.* Academic Press, Nueva York. 250 p.
- Zelitch, A. y Berlyn, M. B. 1982. Altered glycine decarboxylation inhibition in isonicotinic acid resistant mutant callus lines and in regenerated plant and seed progeny. *Plant Physiol.* 69:198-204.