

Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de caña de azúcar a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*

Marisol Freire-Seijo*, Rafael G. Kosky, Idalia Herrera Ofarril, Maritza Reyes. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: marisolf@ibp.co.cu

RESUMEN

La embriogénesis somática, técnica de propagación y herramienta para el mejoramiento genético en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido), ha presentado múltiples inconvenientes que los protocolos de regeneración descritos en la literatura no han sido capaces de resolver. La presente investigación se realizó con el objetivo de desarrollar una nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de caña de azúcar, var. C 87-51, vía embriogénesis somática a partir de segmentos de la vaina de las hojas de plantas *in vitro*, colocados directamente en medio de cultivo líquido. Los resultados demostraron que es posible formar callos con estructuras embriogénicas a partir del segmento dos de la vaina de las hojas; lo cual reduce el tiempo de cultivo *in vitro* y garantiza la calidad fisiológica y fitosanitaria de las plantas que se regeneran. A partir de los callos con estructuras embriogénicas se establecieron líneas homogéneas de suspensiones celulares formadas por agregados embriogénicos.

Palabras clave: embriogénesis somática, plantas *in vitro*, *Saccharum* spp. híbrido

ABSTRACT

The somatic embryogenesis, propagation technique and tool for the genetic improvement in sugar cane (*Saccharum* spp. hybrid), has presented multiple inconveniences that the regeneration protocols described in the literature have not been able to solve. The present research was carried out with the objective of developing a new methodology for the establishment of cells suspensions of sugar cane, var. C 87-51, somatic embryogenesis starting from segments of the sheath of the leaves of plants *in vitro*, placed directly in a liquid culture medium. The results demonstrated that it is possible to form callus with embryogenic structures starting from the segment two of the sheath of the leaves which reduces the time of culture *in vitro* and guarantees the physiologic and phytosanitary quality of the plants that are regenerated. Homogeneous lines of cellular suspensions formed by embryogenic aggregates were established starting from callus with embryogenic structure.

Key words: *in vitro* plant, *Saccharum* spp. hybrid, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

En caña de azúcar han sido desarrollado protocolos para la propagación *in vitro* de plantas a través de yemas axilares (Gosal *et al.*, 1998), la transformación genética y la inducción de variación somaclonal (Kaur *et al.*, 2002) y la regeneración de plantas vía embriogénesis somática (Gill *et al.*, 2004).

Para el desarrollo de la embriogénesis somática en caña de azúcar se han utilizado varias fuentes de explantes durante la iniciación del proceso. Guiderdoni (1986) refiere por primera vez la obtención de callos y embriones somáticos a partir de hojas de plantas cultivadas *in vitro*, al utilizar medios de cultivo semisólidos. Desde el punto de vista teórico, el empleo de este tipo de explante garantiza la sanidad de las plantas regeneradas y además, posibilita en la práctica, disponer de una fuente estable de material vegetal durante todo el año. Sin embargo, la utilización de medios de cultivo semisólidos durante la formación de

callos, continúa siendo una limitante. Bajo estas condiciones de cultivo se incrementa el período de cultivo *in vitro*, ya que es necesario realizar varios subcultivos de multiplicación de los callos. En consecuencia aumenta la posibilidad de que aparezcan individuos con variabilidad genética; sin dejar de mencionar que se hace laboriosa la manipulación del material vegetal. Estas dificultades se pudieran solucionar con el empleo de medios de cultivo líquidos desde el momento en que se inicia la formación del callo con estructuras embriogénicas, tal como lo sugieren Holst *et al.* (1996) para especies dicotiledóneas.

Esta investigación propone desarrollar una metodología de trabajo en la que se empleen como explantes iniciales segmentos de la vaina de hojas de plantas de caña de azúcar cultivadas *in vitro* colocados en medios de cultivo líquido para inducir la formación de callos con estructuras embriogénicas, así como establecer suspensiones celulares embriogénicas a partir de estas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se empleó la variedad de caña de azúcar Cuba 87-51 (progenitores Co 281 x POJ 2878) y se seleccionaron plantas en campo de 6.0-10 meses de cultivo con buen aspecto fitosanitario y fisiológico.

El establecimiento *in vitro*, saneamiento y diagnóstico de los explantes se realizó según lo recomendado por Hernández *et al.* (1997) y Peralta *et al.* (1997). Las plantas *in vitro* fueron subcultivadas según la metodología propuesta por Jiménez *et al.* (1997) y sólo se tomaron aquellas que se encontraban entre el tercer y séptimo subcultivo de multiplicación, con más de dos milímetros de grosor en la zona de la vaina de las hojas.

A partir de experimentos preliminares se seleccionó el segmento 2 (Figura 1) para la formación de los callos con estructuras embriogénicas.

Condiciones de cultivo

Para su crecimiento los explantes se colocaron en cámara de crecimiento en condiciones de oscuridad y temperatura de $27 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

Siempre que se utilizaron medios de cultivo en estado líquido se colocaron los recipientes de cultivo en agitador orbital (Infors-HT) a $27 \pm 2.0^\circ\text{C}$, 90rpm y oscuridad continua.

Análisis estadístico

Los procesamientos estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 13.0 para

Windows. En cada experimento se especifican los análisis realizados a los datos.

Formación de callos en medio de cultivo líquido

Influencia de la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la formación de callos con estructuras embriogénicas

Este experimento se realizó con el objetivo de formar callos con estructuras embriogénicas al colocar los explantes directamente en medios de cultivo líquido.

En cada Erlenmeyer de 250ml se colocaron seis segmentos de la vaina y 50 ml de medio de cultivo compuesto por las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) y los compuestos que se muestran en la tabla 1. El pH fue ajustado después de la esterilización a 5.6.

Esta forma de manejo de los explantes y la composición de los medios de cultivo se utilizó en los experimentos siguientes.

Se incluyeron en el estudio cinco concentraciones de 2,4-D entre 2.0 mg.l^{-1} y 4.0 mg.l^{-1} (2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mg.l^{-1}). Las evaluaciones se realizaron a los 30 días de cultivo teniendo en cuenta el número de explantes con formación de estructuras embriogénicas por Erlenmeyer (para el cálculo posterior del porcentaje), gramos de masa fresca (gMF) por Erlenmeyer, el número de células parenquimatosas, el número de células meristemáticas, la vitalidad celular y el número de agregados celulares embriogénicos por mililitro de suspensión.

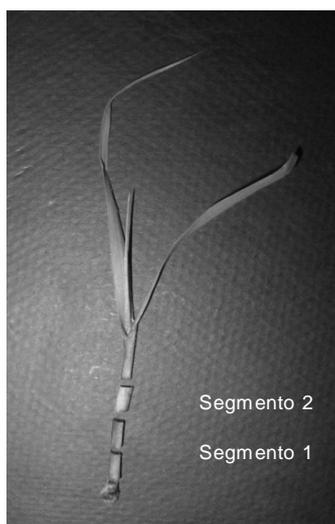


Figura 1. Posición de los segmentos uno y dos en las plantas *in vitro* de caña de azúcar. Segmento 1: se eliminó la base de las plantas *in vitro* (2.0 - 3.0mm) y se tomó un cilindro de la vaina de las hojas aproximadamente de 0.5cm de largo. Segmento 2: por encima del segmento uno se tomó un cilindro de aproximadamente 0.5cm de largo.

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo empleado para el establecimiento de las suspensiones celulares de *Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51 junto con las sales MS.

Compuestos	Concentración
Vitaminas Heinz y Mee (1969)	10 ml.l ⁻¹ .
Mio-inositol	100 mg.l ⁻¹
Arginina	50 mg.l ⁻¹
Caseína hidrolizada	1.0 g.l ⁻¹
Ácido cítrico	50 mg.l ⁻¹
Agua de coco	50 ml. l ⁻¹
Sacarosa	40 g.l ⁻¹

La determinación de la vitalidad celular y los conteos celulares se realizaron de forma similar en todos los experimentos que así lo requirieron y para ello se utilizó el Diacetato de fluoresceína (FDA) según la técnica de Widholm (1972). Los conteos celulares, la clasificación de las células y el conteo de agregados celulares se efectuaron en cámara de Fuch-Rosental 0.2 mm de profundidad. Las observaciones se realizaron con el auxilio de un microscopio óptico (Axioskop, Zeiss) con excitación a 450 - 490 nm y fluorescencia a 510-520 nm y un aumento 100x.

La vitalidad celular fue expresada en porcentaje (%) de células vivas.

El número de células se determinó por la siguiente ecuación matemática (Cevallos, 2000):

$$\text{No. de células. ml}^{-1} = \frac{\text{No. de células contadas}}{\text{No. de cuadrículas contadas}} \times \text{FC} \times \text{FD}$$

Donde: FC= Factor de la cámara (5x10³)
FD= Factor de dilución.

Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones que fueron evaluadas simultáneamente.

Efecto de la frecuencia del cambio de medio de cultivo sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas

El objetivo con este experimento fue definir con qué frecuencia realizar los cambios de medio de cultivo para obtener mayor número de callos con estructuras embriogénicas.

Se empleó el medio de cultivo y la concentración de 2,4-D determinada en el experimento anterior.

Se conformaron tres tratamientos en los que la frecuencia de los cambios de medio de cultivo fueron de siete días, 15 días y al último de los tratamientos nunca se le hizo cambio. En cada oportunidad se retiró y repuso con medio de cultivo fresco el 30% del que se encontraba en el Erlenmeyer.

Se efectuó sólo una evaluación a los 30 días de cultivo y contempló el número de células parenquimatosas y meristemáticas, el número de agregados celulares. ml⁻¹ (datos empleados para el cálculo posterior del porcentaje) y la masa fresca (GMF) por Erlenmeyer. Todos los tratamientos contaron con cinco repeticiones que se muestrearon de forma simultánea.

Los datos obtenidos en los experimentos para la formación de callos con estructuras embriogénicas fueron procesados estadísticamente utilizando un análisis de varianza simple, el grado de significación fue determinado mediante las pruebas de Duncan y Tukey.

Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas

Los callos con estructuras embriogénicas formados a partir de las hojas de plantas *in vitro* en medios de cultivo líquido se colectaron mediante mallas de 315 micrómetros y se seccionaron, en caso necesario, en fragmentos de aproximadamente 4.0 mm de diámetro.

Posteriormente se colocaron en Erlenmeyers con capacidad para 25 ml, se adicionaron 2.0 ml de medio de cultivo descrito anteriormente con 0.5 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Se observaron diariamente y en caso necesario se adicionó medio de cultivo hasta llegar a 5.0 ml de volumen total (volumen celular más volumen de medio de cultivo).

Cada una de las masas de embriones formadas constituyó una línea independiente y no se mezclaron a lo largo de todo el proceso.

A los 10 días de cultivo se colectó la suspensión celular, con empleo de pipetas Pasteur, y se dejó decantar en un tubo cónico graduado de 15 ml para conocer el volumen de células sedimentadas (VCS) (Schoof, 1997). Conocido el volumen que ocupaban las células en el tubo se colectaron nuevamente y se colocaron en un Erlenmeyer de 100 ml de capacidad. Posteriormente y de igual forma se realizó otra transferencia a Erlenmeyers de 250 ml de

capacidad. Durante esta etapa se utilizó una densidad celular de 5.0% de VCS. Semanalmente se evaluó la vitalidad celular y se realizaron los conteos celulares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callos en medio de cultivo líquido

Influencia de la concentración de 2,4-D en la formación de callos con estructuras embriogénicas

Fue posible formar callos con estructuras embriogénicas al colocar los explantes directamente en medios de cultivo líquido. En todos los tratamientos, al tercer día de cultivo, las hojas internas del explante se alargaron aproximadamente 1.0 cm por cada extremo (Figura 2A). A los 12 días de cultivo apareció un callo de apariencia acuosa y grisáceo, en cada uno de los extremos del explante.

En el tratamiento que se adicionó una concentración de 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D se produjo una biomasa de 7.97 gMF por Erlenmeyer; que no mostró diferencias estadísticas con el tratamiento de mayor producción

de biomasa (3.5 mg.l⁻¹) y produjo, además, el mayor porcentaje de explantes con callos con estructuras embriogénicas y número de agregados embriogénicos por mililitro de medio de cultivo (Tabla 2).

Al adicionar concentraciones mayores de 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, se incrementó el número de células meristemáticas aisladas lo cual es una característica indeseable para las suspensiones celulares embriogénicas. Según Merkle *et al.* (1995) la formación de células meristemáticas aisladas se debe a alteraciones en el pH del citoplasma y la pared celular, así como a los cambios en los niveles de iones Ca⁺² libres, provocados por la exposición a elevadas concentraciones de auxina.

De forma general fue incrementándose el porcentaje de estas células meristemáticas aisladas en la medida en que se aumentó la concentración de 2,4-D. Por otra parte, la formación de células parenquimatosas fue sinónimo de envejecimiento de la suspensión celular y constituye uno de los indicadores para afirmar que un cultivo de células embriogénicas no tiene calidad.

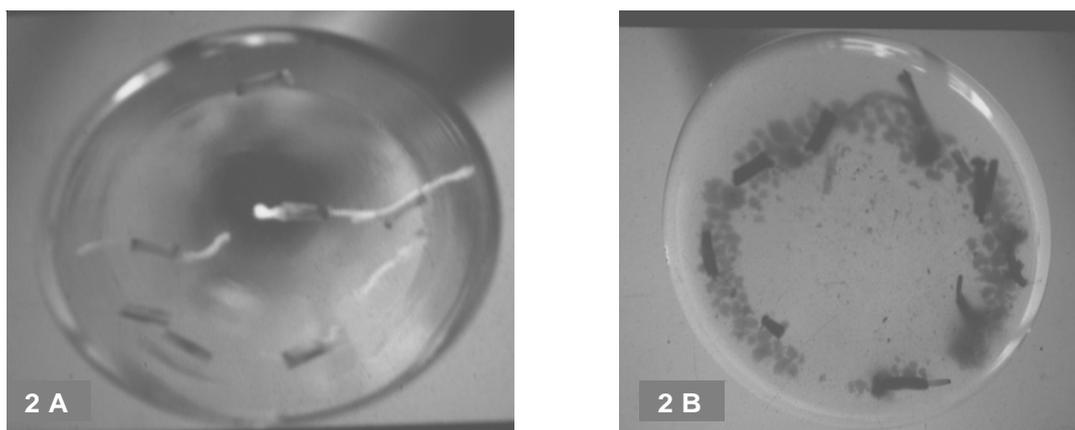


Figura 2. Segmentos de plantas *in vitro* de *Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51 a los tres días de crecimiento en medio de cultivo líquido (A) y a los 30 días (B).

Tabla 2. Efecto del 2,4-D en la formación de callos con estructuras embriogénicas y en la composición celular de suspensiones celulares de *Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51.

2,4-D (mg.l ⁻¹)	gMF por frasco.	No. explantes con callos con estructuras embriogénicas/ Erlenmeyer (%)	No. Células Parenquimatosas (%)	No. Células Meristemáticas (%)	Agregados embriog.ml ⁻¹ (x 10 ⁴)
2.0	6.55b	77.8ab	77.8a	22.18c	--
2.5	6.75b	75.5ab	83.5a	16.40d	0.05d
3.0	7.97a	83.3a	84.4a	15.60d	0.22a
3.5	7.98a	72.4b	54.0c	45.90b	0.16b
4.0	7.96a	77.7ab	29.7d	70.20a	0.10c
C.V.	5.68%	10.21%	11.06%	9.66%	4.23%

Medias con letras distintas en una misma columna difieren para $p < 0.05$ según la prueba Tukey. CV- coeficiente de variación.

Con respecto a la vitalidad celular no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos; los valores oscilaron entre 94.8% y 95.4% de células vivas.

Holst *et al.* (1996), en varias especies vegetales, recomiendan colocar los explantes directamente en medio de cultivo líquido lo que favorece la rápida formación de callos con estructuras embriogénicas y el incremento de la biomasa de embriones somáticos. Estos autores plantean que resulta imposible emplear comercialmente los callos como fuente de formación de embriones somáticos debido a que es necesario extender los períodos de cultivo *in vitro* y exigen una mayor manipulación para su multiplicación.

Kosky (1996), para la formación de callos en medio de cultivo semisólido en la variedad C87-51 a partir de explantes de hojas de plantas de campo también recomendó la concentración de 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Autores como Gnanapragasam y Vasil (1990) y Taylor *et al.* (1992) utilizaron 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D pero en variedades diferentes a la estudiada en el presente trabajo.

Efecto de la frecuencia de los cambios de medio de cultivo durante la etapa de formación de callos con estructuras embriogénicas

La frecuencia de cambio de medio de cultivo tuvo una marcada influencia sobre la composición celular, el crecimiento celular y la masa fresca de las suspensiones celulares.

En la tabla 3 se puede observar que, al realizar los cambios de medio de cultivo cada siete y 15 días, no se obtuvieron diferencias estadísticas en la variable masa fresca (gMF). Sin embargo, existieron diferencias estadísticas entre estos dos tratamientos en cuanto al porcentaje de células meristemáticas, parenquimatosas y el número de agregados, manifestando un mayor envejecimiento del cultivo celular el tratamiento en el que se realizaron los cambios de medio de cultivo cada 15 días.

Cuando se realizaron los cambios de medio de cultivo cada siete días se formó la mayor cantidad de agregados embriogénicos por mililitro (0.5 X10⁴ agregados). Según Williams y Maheswaram (1986) la composición celular es considerada como un indicador de la condición embriogénica de un cultivo, la calidad del explante inicial y las adecuadas condiciones de cultivo.

Estos resultados no difieren de los descritos por Holst *et al.* (1996), quienes realizando los cambios de medio de cultivo cada siete días en las especies *Cyclamen* y *Lycopersicum sculentum* (tomate), formaron callos con estructuras embriogénicas a

partir de explantes colocados directamente en medio de cultivo líquido. Además, comprobaron que monitoreando el consumo de auxina por las técnicas de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), fue posible determinar el momento adecuado para realizar los cambios de medios de cultivo en la suspensión celular, método por el cual reponían las cantidades de auxina (2,4-D) consumidas por las células durante su cultivo.

La suspensión celular formada en todos los tratamientos estaba compuesta por pocos agregados embriogénicos, esta característica impidió que fueran utilizadas para la fase de multiplicación. El objetivo fundamental fue multiplicar suspensiones celulares embriogénicas y homogéneas por lo que se prefirió utilizar los callos con estructuras embriogénicas para el establecimiento de nuevas suspensiones celulares.

Este método de trabajo ha sido utilizado en especies como el *Cyclamen*, tomate (*Solanum lycopersicum*), pepino (*Cucumis sativus* L.), remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), pimiento (*Capsicum annum* L.), *Viola odorata* L. y *Pelargonium* sp. L. (Holst *et al.*, 1996). Por tanto, resulta viable el colocar los explantes directamente en medio de cultivo líquido para formar callos con estructuras embriogénicas o embriones somáticos.

El empleo de medios de cultivo líquidos durante esta etapa, permite reducir el tiempo de cultivo *in vitro*, mientras, que con el empleo de los medios de cultivo semisólidos es necesario realizar la siembra de los explantes y al menos dos subcultivos de multiplicación de los callos (cada subcultivo consume entre 28-30 días). Al emplear medios de cultivos líquidos no se realizan subcultivos y los callos con estructuras embriogénicas están listos para establecer las suspensiones celulares embriogénicas sólo en 30 días de cultivo. Esto permite disminuir el tiempo de exposición al 2,4-D y por tanto los riesgos de variación somaclonal.

Fich y Moore (1993), a pesar de que emplearon bajos niveles de 2,4-D durante el proceso embriogénico, obtuvieron un gran número de plantas albinas debido a que los callos se sometieron a sucesivos subcultivos de multiplicación, sin tener en cuenta que el factor tiempo provoca efectos similares a las altas concentraciones de reguladores del crecimiento.

Establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas

Al colocar fragmentos de callos con estructuras embriogénicas en Erlenmeyers pequeños (25 ml de capacidad) fue posible establecer suspensiones

celulares embriogénicas que no se mezclaron entre sí se pudieron formar líneas celulares.

Niubó *et al.* (2000) comprobaron que al establecer líneas celulares se obtenía reproducibilidad de los caracteres fisiológicos de crecimiento y de los caracteres bioquímicos de la célula. Por lo tanto, la utilización de este método de trabajo brinda la posibilidad de diferenciar entre líneas con alto o bajo potencial embriogénico y conservar muestras celulares con potencial embriogénico conocido. En plátanos y bananos Schoofs *et al.* (1999) y Kosky *et al.* (2000) han obtenido resultados con la creación de líneas celulares, lo cual garantiza la

repetibilidad de los resultados al utilizar sólo una línea en los diferentes experimentos.

Al iniciarse las suspensiones celulares, las células parenquimatosas representaban un 25.3% del total. Desde el comienzo de esta fase se observaron pequeños agregados de células embriogénicas en la suspensión celular. A medida que se realizaron los subcultivos a los Erlenmeyers de 100ml y 250ml, el porcentaje de células parenquimatosas disminuyó hasta eliminarse y formarse una suspensión celular homogénea compuesta solamente por agregados embriogénicos (Figura 3).

Tabla 3. Influencia de la frecuencia de cambio de medio de cultivo sobre la composición celular de suspensiones celulares de durante la formación de los callos con estructuras embriogénicas.

Frecuencia de Cambio de medio de cultivo (días)	No. de Células Parenquimatosas (%)	No. de Células Meristemáticas (%)	Agregados celulares/ml ($\times 10^4$)	gMF/Erlenmeyer
0	42.37c	57.63c	--	6.02c
7	18.84a	81.16a	0.5a	8.91a
15	38.02b	61.98b	0.1b	8.36b
C.V.	9.56%	5.69%	3.04%	2.91%

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba Tukey.



Figura 3. Aspecto de las suspensiones celulares embriogénicas de *Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51 establecida a partir de estructuras embriogénicas formadas en medio de cultivo líquido.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten plantear que al colocar el segmento dos de la vaina de hojas de plantas de *Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51 cultivadas *in vitro* directamente en medio de cultivo líquido con 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, es posible obtener callos con estructuras embriogénicas. De estos además, se pueden establecer suspensiones celulares embriogénicas.

REFERENCIAS

- Barceló, C, Nicolás, G, Sabater B, Sánchez R (1995) Fisiología Vegetal. Séptima edición. Ediciones pirámides S.A. Madrid
- Cevallos, A (2000) Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto (*Coffea* spp.), mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana
- Cruz da Rocha, S, Quairin M (2004) Colageneses e Rizogeneses em explantes de Mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. Ciencia Forestal, Santa María 14: 91-101
- Fitch, M, Moore P (1990) Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. Plant Cell Tissue and Organ Culture 20: 157-163
- Fitch, M, Moore P (1993) Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture 32: 335-343
- Gill NK, Gill R, Gosal SS (2004) Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Ind.J. Biotechnol. 3: 119-123
- Gosal SS, Thind KS, Dhaliwal HS (1998) Micropropagation of sugarcane a efficient protocol for commercial plant production. Crop Improv. 25: 1-5
- Gnanapragasam, S, Vasil I (1990) Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a comercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.). Plant Cell Reports 9: 419-423
- Kosky, R (1996) Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*U. scitaminea* Syd.) de la caña de azúcar (*Saccharum* spp., híbrido). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana
- Kosky, Guilliard T, Barranco L, Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FIHA-18 (AAAB). INFOMUSA 9 (1):12-16
- Guideroni, E (1986) L'Embryogenese somatique des explants foliaires de canne a sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. Initiation des cultures. Le Agronomie Tropicale 41-1: 50-58
- Heinz, D, Mee G (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop. Sci. 9: 346-348
- Hernández, R, González, Y, Bernal, F, Igarza, Y, Sarria, Z, Pichardo T, Martínez Y (1997) Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido). BIOVEG 97. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. del 2 al 5 de abril de 1997. Ciego de Avila, Cuba
- Holst, G, Mare, K, Wiert, M, Postman H, Abbestee R (1996) Somatic embryogenesis Method. Unite States Patent. Patent number 5,587.p.312
- Jiménez, E, García, L, Suárez M, Alvarado Y (1997) Instructivo Técnico para la Microrpogación de la caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Santa Clara
- Kaur A, Gill R, Gosal SS and Thind KS (2002) Induction of plant regeneration and somaclonal variation for some agronomic traits in sugarcane. Crop Improv. 28: 173-176
- Kintziou, S, Sereti, E, Bluchos, P, Drossopoulos, J, Kitsaki, Liosa A (2002) Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Reports 21: 1-8
- Liu, M (1992) Plant regeneration in cell suspension cultures of sugarcane as affected by activated charcoal, medium composition and tissue source. The SABRAO International Symposium on the impact of Biological Research on Agricultural Productivity
- Medena M, Sotolongo R (2004) Avances en el cultivo de tejidos de *Swietenia macrophylla* King X *Swietenia mahogany* Jaco. Revista Forestal Baracoa (2) 23:19-26
- Merkle, S, Parrott W, Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: T Thorpe (Ed.) *In vitro* Embryogenesis in Plant, pp.155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Niubó, E, Maribona R, Sánchez C (2000) Caracterización morfológica de una línea celular de caña de azúcar. Revista CENIC Ciencias Biológicas 31 (3): 173-176
- Parrott, W (2002) La embriogénesis somática en las angiospermas. En: Resúmenes VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, IBP. Santa Clara
- Peralta, E, Martínez, B, González, C (1997) Control fitosanitario en el programa de micropropagación de caña de azúcar en Cuba. En: Libro de resúmenes Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Palacio de las Convenciones. Cuba. La Habana
- Schoof, H (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. Dissertationes de Agricultura. Catholic University of Leuven, Belgium
- Schoof, H, Panis, B, Strosse, H, Mayo, A, López, J, Roux, N, Dolezel J, Swennen R (1999) Cuellos de botella en la regeneración y mantenimiento de las suspensiones celulares morfológicas de bananos y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellos. INFOMUSA 8(2): 3-7
- Taylor, P, Ko, H, Adkins, S, Rathus C, Birch R (1992) Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). Plant Cell Tissue and Organ Culture 28: 69-78
- Widholm, J (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. Stain Technology 47: 189-194
- Williams, E, Maheswaran M (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. Annals of Botany 57: 443-462