

Variabilidad fenotípica en campo de plantas de *Saccharum* spp. híbrido cv. 'C87-51' regeneradas vía embriogénesis somática

Marisol Freire-Sejio, Rafael Gómez-Kosky, Idalia Herrera, Maritza Reyes, Manuel de Feria, Raúl Barbón, Elio Jiménez

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 54830. e-mail: marisolf@ibp.co.cu

RESUMEN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo de gran importancia económica que se ha propagado por cultivo de tejidos mediante organogénesis y embriogénesis somática. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la variabilidad fenotípica en campo de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' obtenidas mediante embriogénesis somática en medios de cultivo líquido. Fueron plantadas en campo plantas regeneradas a partir de embriones somáticos junto a plantas propagadas vía organogénesis y de estacas que se utilizaron como control. Las evaluaciones se efectuaron a los siete meses de la plantación en caña planta y primer retoño y las variables evaluadas fueron altura del tallo, diámetro del tallo, número de tallos por plantón, número de hojas activas por tallo y Brix. Además, se describieron características morfológicas. No se encontraron plantas fuera de tipo en las poblaciones evaluadas. Los resultados demostraron que la vía de regeneración de plantas influye significativamente en el desarrollo de las plantas en condiciones de campo. La propagación de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' por embriogénesis somática en medio de cultivo líquido solo induce variaciones fenotípicas en campo asociadas al rejuvenecimiento *in vitro* similares a las referidas previamente para plantas obtenidas por organogénesis y por tanto puede ser empleada como un método de propagación masiva de plantas.

Palabras clave: biorreactor, caña de azúcar, embrión somático, variación somaclonal

Phenotypic variability in the field of *Saccharum* spp. hybrid cv. 'C87-51' plants regenerated via somatic embryogenesis

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is a crop of great economic importance that has been propagated by tissue culture through organogenesis and somatic embryogenesis. The present research had as objective to determine the phenotypic variability in the field of sugar cane cv. 'C87-51' plants obtained by somatic embryogenesis in liquid culture media. Plants regenerated from somatic embryos were planted in the field next to plants propagated via organogenesis and from cuttings that were used as control. The evaluations were carried out seven months after planting in cane plant and first shoot and the variables evaluated were stem height, stem diameter, number of stems per seedlings, number of active leaves per stem and Brix. Besides, morphological characteristics were described. Plants out of type were not found in the evaluated populations. The results demonstrated that the plant regeneration pathway significantly influences the development of plants under field conditions. The propagation of sugarcane plants cv. 'C87-51' by somatic embryogenesis in liquid culture medium only induces phenotypic changes in field associated with *in vitro* rejuvenation similar to those previously reported for plants obtained by organogenesis. Therefore, it can be used as a method of mass propagation of plants.

Keywords: bioreactor, somatic embryos, somaclonal variation, sugarcane

INTRODUCCIÓN

Para cada sistema de regeneración de plantas que se desarrolle es necesario validar la respuesta en campo de las plantas. Este paso debe ser realizado independientemente del uso final que se les dé (propagación o mejora genética). En caña de azúcar (*Saccharum* spp.)

existe poca información sobre la respuesta en campo de plantas obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos. A pesar de ello la embriogénesis somática es, potencialmente, un método eficiente de regeneración para la clonación y la transformación genética de la caña de azúcar (Layla, 2003).

Cuando un sistema de regeneración de plantas favorece la aparición de variantes somaclonales se limita seriamente la utilidad de los protocolos para la propagación *in vitro*. Las investigaciones desarrolladas describen que la aparición de variaciones durante la propagación *in vitro* depende, principalmente, del genotipo, la naturaleza quimérica del explante utilizado, las condiciones de cultivo, el mantenimiento del cultivo y el tiempo *in vitro* del material vegetal (Lavanya *et al.*, 2016).

La adición en los medios de cultivo de una mayor concentración de reguladores del crecimiento y subcultivos prolongados atenta, muy especialmente, contra la fidelidad genética de las plantas regeneradas ya que pueden causar anomalías cromosómicas que dan lugar a la producción de plantas fuera de tipo (Suprasanna *et al.*, 2011).

Para sistemas de regeneración de plantas que utilizan la embriogénesis somática se suman riesgos específicos para la aparición de plantas fuera de tipo, entre ellos el origen unicelular de los embriones somáticos y el uso frecuente de auxinas fuertes como el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). El desarrollo de la embriogénesis somática puede efectuarse utilizando medios de cultivo semisólidos o líquidos, estos últimos dan la posibilidad de aplicar las experiencias obtenidas en agitadores orbitales a escala de biorreactores. Ello hace más competitivos los protocolos pues potencialmente son más eficientes y automatizables.

Varios autores han evaluado en campo poblaciones de plantas de caña de azúcar obtenidas por cultivo *in vitro* vía organogénesis (Lal, 1996; Lorenzo *et al.*, 2001; Saini *et al.*, 2004; Sood *et al.*, 2006; Devarumath *et al.*, 2007; Doule *et al.*, 2008; Sandhu *et al.*, 2008; Sobhakumari, 2012). Sin embargo, existen pocas referencias sobre la evaluación de la respuesta en campo de plantas obtenidas vía embriogénesis somática (en medios de cultivo semisólidos) con fines de propagación (Jiménez, 1995, Nieves *et al.*, 2003). Aunque en este cultivo se han empleado medios de cultivo líquido para el desarrollo de la embriogénesis somática (Ahloowalia y Maretzki, 1983) no se encontraron referencias sobre evaluaciones realizadas en campo a plantas obtenidas en estas condiciones de cultivo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la variabilidad fenotípica en campo de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' regeneradas vía embriogénesis somática en medio de cultivo líquido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon plantas *in vitro* de caña de azúcar cv. 'C87-51' regeneradas vía embriogénesis somática según el protocolo propuesto por Freire-Seijo *et al.* (2006) que describe la producción de embriones somáticos con el empleo de agitador orbital y biorreactores. En el estudio fueron incluidas, además, plantas *in vitro* en fase de enraizamiento propagadas por organogénesis (Jiménez, 1995) y estacas, de plantas cultivadas en campo, con tres yemas (método de propagación a escala productiva) como controles.

A condiciones *ex vitro* se transfirieron plantas *in vitro* regeneradas por embriogénesis somática (ES) a partir de la germinación de embriones somáticos obtenidos en agitador orbital y en biorreactor así como plantas *in vitro* propagadas por organogénesis. En todos los casos 2000 plantas.

La casa de cultivo estaba cubierta con malla de plástico, que redujo la intensidad luminosa en un 70%. Se utilizaron cajas de polipropileno con 70 orificios y un sustrato formado por una mezcla de materia orgánica y zeolita (3:1). En cada orificio se colocó una planta. El riego se realizó con microaspersores a través del sistema Microjet con una frecuencia de 2 minutos y seis irrigaciones por día. Con esta frecuencia, se garantizó una humedad relativa entre el 85-90%. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante 45 días previo a su plantación en campo.

Variabilidad fenotípica en campo

Los experimentos de campo fueron ejecutados en la Estación Experimental Pedro Lantigua del Municipio de Remedios, Provincia Villa Clara, en suelo ferralítico rojo y con condiciones de secano.

Se realizaron dos ensayos y en ambos se empleó un diseño de bloques al azar con cuatro

réplicas por tratamiento. Las parcelas tenían 7.5 m de largo y cinco surcos cada una. La densidad de plantación cuando se emplearon estacas fue de 12 yemas por metro lineal con estacas de tres yemas. En el caso de las plantas procedentes de cultivo *in vitro* (organogénesis y embriogénesis somática) se plantaron a una distancia de 0.50 m (15 plantas por surco) y se le realizaron riegos de supervivencia dos veces por semana durante el primer mes.

Se aplicó fertilización con fórmula completa en el momento de la siembra 75 kg ha⁻¹ de nitrógeno, 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ y 50 kg ha⁻¹ de K₂O y nitrógeno (75 kg) en forma de urea a los tres meses de la plantación.

En el primer ensayo se compararon plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir de la germinación de embriones somáticos obtenidos en agitador orbital, con plantas propagadas por organogénesis y estacas.

En el segundo ensayo se compararon plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir de la germinación de embriones somáticos obtenidos en biorreactor, con plantas propagadas por organogénesis y estacas. La plantación se realizó en el mes de marzo.

Las evaluaciones se efectuaron a los siete meses de la plantación en caña planta y primer retoño y las variables evaluadas a 90 plantas de cada bloque seleccionadas al azar fueron: altura del tallo (cm), diámetro del tallo (mm), número de tallos por plantón, número de hojas activas (hojas completamente extendidas) por tallo y Brix (%).

En ambos ensayos en las poblaciones de plantas se describieron variables morfológicas que caracterizan el cv. 'C87-51' según Bernal *et al.* (1999) tales como: color del tallo, forma de la yema, presencia de pelos, forma del *dewlap* (la última unión limbo-vaina visible), forma de la aurícula, forma del entrenudo y hábito de crecimiento.

Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante el con el paquete computacional StatGraphics versión

5.0 sobre Windows. Se comprobaron los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Para la comparación de las medias se utilizó la prueba de Duncan para $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los dos ensayos realizados no se encontraron plantas fuera de tipo en las poblaciones evaluadas.

Las plantas obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos producidos en agitador orbital presentaron hábito de crecimiento similar a las plantas regeneradas vía organogénesis, con aumento del número de tallos y disminución en el diámetro, respecto a las plantas de estacas. Además, no se encontraron diferencias en cuanto al Brix (19.5% - 19.8%), ni en el número de hojas activas por planta (9.23 - 9.85) (Tabla 1).

En el primer retoño no se encontraron diferencias significativas entre el diámetro del tallo y la altura de las plantas para los tres tipos de material vegetal empleados. Sin embargo, se mantuvo elevado el número de tallos por plantón en las plantas provenientes de embriones somáticos obtenidos en agitador orbital con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos (Tabla 2).

Los resultados indicaron que el sistema de regeneración utilizado tuvo influencia sobre el desempeño de las plantas en campo, es por ello que todo sistema desarrollado para el mejoramiento genético o la propagación de plantas debe concluir en evaluaciones de campo del material vegetal, donde se consideren indicadores morfo-fisiológicos (Pérez, 1998). En las plantas provenientes del cultivo de tejidos, tanto por la vía de embriogénesis somática como por organogénesis, se evidenció el efecto del rejuvenecimiento provocado por el cultivo *in vitro*.

Se observó un aumento del número de tallos por plantón y disminución de su diámetro. Los resultados mostrados coinciden con lo descrito por Cuenya *et al.* (2007) al comparar semilla de caña de azúcar micropropagada y semilla convencional o semilla tratada con calor, donde

Tabla 1. Respuesta en condiciones de campo de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' (caña planta) obtenidas a partir de embriones somáticos producidos en agitador orbital.

Tratamientos (Material vegetal)	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (mm)	No. tallos/plantón
Estacas	175.26 b	30.80 a	8.10 b
Plantas obtenidas por organogénesis	190.85 ab	26.40 c	9.88 a
Plantas de ES obtenidos en agitador orbital	199.90 a	28.55 b	9.98 a
EE	± 5.69	± 0.49	± 0.46
CV	13.5%	1.3%	21.3%

Medias con letras no comunes difieren para $p < 0.05$ según la comparación múltiple basada en la prueba de Duncan. ES: embriones somáticos, EE: error estándar, CV: coeficiente de variación. $n=90$

Tabla 2. Respuesta en condiciones de campo de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' (primer retoño) regeneradas de embriones somáticos producidos en agitador orbital.

Tratamientos	No. tallos/plantón
Estacas	5.1 b
Plantas obtenidas por organogénesis	5.2 b
Plantas de ES obtenidos en agitador orbital	9.1 a
EE	± 0.89
CV	51.3%

Medias con letras no comunes difieren para $p < 0.05$ según la comparación múltiple basada en la prueba de Duncan. ES: embriones somáticos, EE: error estándar, CV: coeficiente de variación. $n=90$

señalaron que la semilla micropropagada presentaba un incremento en el número de tallos y crecimiento y como consecuencia mostraron mayor rendimiento. De igual forma, Wendling *et al.* (2014) en su investigación respecto a las plantas propagadas *in vitro* indicaron que como resultado del rejuvenecimiento o cambios temporales, encontraron variaciones tales como incremento en el número de tallos o ramas, retardo en la floración, aumento de la susceptibilidad a una enfermedad y otras características, las cuales influyeron en el rendimiento en el campo.

El contenido de Brix (18.7% – 18.2%) y el número de hojas activas por planta (4.2 – 4.6)

no mostraron diferencias entre los tratamientos en el primer retoño. Autores como Carrillo-Castañeda *et al.* (2002) también han concentrado sus investigaciones en comparar los cambios morfológicos y fisiológicos provocados por el cultivo de callos y yemas axilares en tres variedades de caña de azúcar y plantearon que no hubo variaciones genéticas discernibles y que la variación somaclonal y clonal fue de la misma magnitud independientemente de la variedad.

En el segundo experimento se corroboró la influencia del sistema de regeneración sobre las variables evaluadas. Se observó que a pesar de que el cultivo *in vitro* en general provocó incrementos en el número de tallos,

Tabla 3. Respuesta en condiciones de campo de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' regeneradas de embriones somáticos producidos en biorreactor. Evaluación en caña planta.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (mm)	No. tallos/plantón
Estacas	295 b	27.0 a	8.0 c
Plantas obtenidas por organogénesis	299 a	25.6 b	11.5 b
Plantas de ES obtenidos en biorreactor	300 a	25.6 b	13.5 a
EE	±6.6	± 0.063	± 0.79
CV	20%	15%	52%

Medias con letras no comunes difieren para $p < 0.05$ según la comparación múltiple basada en la prueba de Duncan. ES: embriones somáticos, EE: error estándar, CV: coeficiente de variación. n= 90

Tabla 4. Respuesta en condiciones de campo de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' (primer retoño) regeneradas de embriones somáticos producidos en biorreactor.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (mm)	No. tallos/plantón
Estacas	297.3 b	24.3 a	9.7 b
Plantas obtenidas por organogénesis	331.9 a	23.1 b	10.0 b
Plantas de ES obtenidos en el biorreactor	332.5 a	23.0 b	13.1 a
ES	±6.4	± 0.03	± 0.5
CV	12.8%	13.4%	27.7%

Medias con letras no comunes difieren para $p < 0.05$ según la comparación múltiple basada en la prueba de Duncan. ES: embriones somáticos, EE: error estándar, CV: coeficiente de variación. n= 90

las plantas procedentes de embriones somáticos producidos en biorreactor, presentaron diferencias significativas respecto a las plantas regeneradas vía organogénesis y el control de estacas (Tabla 3), lo que reafirmó que el sistema de regeneración utilizado también tuvo influencia sobre la respuesta de las plantas en campo.

El incremento en el número de tallos en los dos tratamientos de plantas obtenidas *in vitro* se correspondió con una disminución en el diámetro en comparación con el control de estacas. El Brix (21.6% – 22.0%) y el número de hojas activas continuaron manifestándose como caracteres estables y no mostraron diferencias entre los tratamientos.

Estos resultados coinciden con los informados por otros autores que en caña de azúcar han observado que las principales alteraciones relacionadas con el rendimiento se relacionaron con el incremento en el número de tallos y aumento del vigor de las plantas (Jiménez, 1995; Martínez-Montero *et al.*, 2002; Cuenya *et al.*, 2007; Sandhu *et al.*, 2008; Wendling *et al.*, 2014).

En el primer retoño, las plantas obtenidas por organogénesis disminuyeron el número de tallos por plantón. Sin embargo, las plantas regeneradas vía embriogénesis somática mantuvieron un elevado número de tallos (Tabla 4). Similares resultados se obtuvieron en el experimento anterior en el tratamiento con

plantas regeneradas de embriones somáticos formados en agitador orbital. El Brix se mantuvo entre 25.8% y 26.4%, sin diferencias significativas entre los tratamientos.

En las plantas obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos y por organogénesis se observó influencia del cultivo *in vitro* que provocó la disminución del grosor del tallo y aumento del número de tallos por plantón, resultado que se repite en ambos experimentos. La vía de regeneración tiene un efecto directo sobre la variabilidad somaclonal. Al respecto, Krishna *et al.* (2016) clasificó los sistemas de regeneración de forma ascendente, en cuanto a la variabilidad, de la forma siguiente: plantas propagadas *in vitro* vía yemas axilares (organogénesis), yemas adventicias, callos organogénicos y embriogénicos, suspensiones celulares y protoplastos. Todo ello está muy relacionado con el grado de desdiferenciación, las distintas vías de regeneración y los métodos de cultivo (Pérez, 1998).

Los caracteres cualitativos evaluados en las plantas no mostraron diferencias entre los tratamientos analizados y coincidieron con las características descritas para 'C87-51' por Bernal *et al.* (1999), que fueron las siguientes:

- Color del tallo: morado con visos amarillentos
- Forma de la yema: obovada y ovada
- Presencia de pelos: pocos
- Forma del *dewlap*: triangular y color verdoso
- Forma de la aurícula: interna falcada y externa dentoide
- Forma del entrenudo: cilíndrica, con banda cerosa abundante
- Hábito de crecimiento: erecto

Los resultados demostraron que la vía de regeneración de plantas influye significativamente en el desarrollo de las plantas en condiciones de campo. Las variaciones fenotípicas observadas se relacionaron con el rejuvenecimiento que induce el cultivo *in vitro*. En este sentido, refuerzan lo planteado por Chowdhury y Vasil (1993) quienes plantearon que, a pesar del origen unicelular de la embriogénesis somática, el uso de cultivos embriogénicos es menos propenso a la aparición de cambios genéticos debido al proceso de selección de las células durante la formación de los embriones somáticos. En otras especies tales como *Elais quineensis*

Jacq. (palma de aceite) (Merkle *et al.*, 1995), *Theobroma cacao* L. (cacao) (Maximova *et al.*, 2008) y café (Coffea spp.) (Etienne *et al.*, 2016) se han realizado estudios en campo donde se ha demostrado la estabilidad genética de plantas obtenidas por embriogénesis somática.

A pesar de ello, de forma general, se continúa señalando la embriogénesis somática como probable causante de variaciones genéticas y cambios epigenéticos. El 2,4-D, la fuente del explante, el genotipo empleado y el tiempo de permanencia *in vitro* son algunos de los factores que influyen en la aparición de variaciones genéticas y que deben ser atendidos para desarrollar sistemas de regeneración de plantas con fidelidad genética (Moore *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

La propagación de plantas de caña de azúcar cv. 'C87-51' por embriogénesis somática en medio de cultivo líquido solo induce variaciones fenotípicas en campo asociadas al rejuvenecimiento *in vitro* similares a las referidas previamente para plantas obtenidas por organogénesis y por tanto puede ser empleada como un método de propagación masiva de plantas.

REFERENCIAS

- Ahloowalia BS, Maretzki A (1983) Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Rep* 2(1): 21-5; doi: 10.1007/BF00269228
- Bernal N, Morales F, Galvez Y, Jorge I (1999) Variedades de caña de azúcar, Uso y manejo. Publicaciones Imago, Ciudad de La Habana; ISBN: 959-7051-10-9
- Brar DS, Jain SM (1998) Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. En: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement, pp.15-36. Springer Netherlands, Amsterdam; doi: 10.1007/978-94-015-9125-6
- Carrillo-Castañeda G, Guillén A, Cárdenas S (2002) Differentiation of sugarcane cultivars for green energy using microscopy and tissue culture. *Biotecnología Aplicada* 19 (1): 30-33
- Chowdhury M, Vasil I (1993) Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). *Theor Appl Genet* 86 (2): 181-188; doi:10.1007/BF00222077

- Cuenya M, Garcia M, Díaz Romero C, Romero E (2007) Efectos de la calidad de la semilla en los componentes del rendimiento cultural en dos variedades de caña de azúcar. *Revista industrial agrícola de Tucumán* 84 (1): 9-14
- Devarumath, RM, Doule RB, Kawar PG, Naikebawane SB, Nerkar YS (2007) Field performance and RAPD analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants vis-a-vis conventional setts derived plants of sugarcane. *Sugar Tech* 9(1): 17–22
- Doule RB, Kawar PG, Nerkar YS, Devarumath RM (2008) Field performance of promising somaclonal variants and RAPD analysis to assess genetic variation in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding* 68(3): 301–306
- Etienne H, Bertrand B, Dechamp E, Maurel P, Georget F (2016) Are genetic and epigenetic instabilities of plant embryogenic cells a fatality? The experience of coffee somatic embryogenesis. *Human Genet Embryol* 6 (1): 136; doi:10.4172/2161-0436.1000136
- Freire-Seijo M, Kosky G, Herrera IO, Reyes M (2006) Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de caña de azúcar a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Biotecnología vegetal* 6 (1): 51-57
- Jiménez E (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV, Santa Clara, Cuba
- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M, Sadh R K (2016) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6 (1): 54; doi:10.1007/s13205-016-0389-7
- Lal Nand (1996) Comparative field performance of micropropagated plant of sugarcane. *Indian Journal of Sugarcane Technology* 11(1): 29-31
- Lavanya AR, Muthukumar M, Muthukrishnan S, Kumaresan V, Senthil T, Kumar M, Vijaya V, Rao MV (2016) Effect of plant growth regulators and additives on indirect organogenesis of *Simarouba glauca*. En: Anis M, Ahmad N (eds) *Plant Tissue Culture: propagation, conservation and crop improvement*, pp. 71-82, Springer, Dordrecht; ISBN: 978-981-10-1916-6
- Layla AZ (2003) Sugar cane production. Patent EP1007629 B1, 24/09/2003
- Lorenzo JC, Ojeda E, Espinosa A, Borroto C (2001) Field performance of temporary immersion bioreactor derived sugarcane plant. *Biol Plant* 37 (6): 803-806; doi:10.1007/s11627-001-0133-8
- Maximova SN, Young A, Pishak S, Gultinan Mark J (2008) Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* (2008) 44: 487; doi:10.1007/s11627-008-9130-5
- Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*, pp. 155–203. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; doi: 10.1007-978-94-011-0485-2_5-1
- Moore LS, Stolovicki E, Braun E (2013) Population dynamics of metastable growth-rate phenotypes. *PLoS ONE* 8(12): 1671; doi:10.1371/journal.pone.0081671
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497
- Nieves N, Zambrano Y, Tapia R, Cid M, Pina D, Castillo R (2003) Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants. *Plant Cell and Organ Culture* 75: 279–282
- Pérez J (1998) Variación somaclonal. En: Pérez Ponce JN (ed) *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*, pp.105-121. IBP, Santa Clara; ISBN: 959-7122-02-2
- Saini Navinder, Saini ML, Jain RK (2004) Large-scale production, field performance and RAPD analysis of micropropagated sugarcane plants. *Indian J Genet* 64(2): 102-107
- Sandhu S, Gosal S, Thind K, Uppal S, Sharma B, Meeta M, Singh K, Cheema G (2008) Field performance of micropropagated plants and potential of seed cane for stalk yield and quality in sugarcane. *Sugar Tech* 11: 34–38
- Sobhakumari V P (2012) Assessment of somaclonal variation in sugarcane. *African Journal of Biotechnology* 11(87): 15303-15309; doi: 10.5897/AJB12.1627
- Sood Neeru, Gupta Piyush K, Srivastava RK, Gosal SS (2006) Comparative studies on field performance of micropropagated and conventionally propagated sugarcane plants. *Plant Tissue Cult. & Biotech* 16 (1): 25-29; doi: 10.3329/ptcb.v16i1.1102
- Suprasanna P, Patade VY, Desai NS, Devarumath RM, Kawar PG, Pagariya MC, Ganapathi A, Manickavasagam M, Babu KH (2011) *Biotechnological Developments in sugarcane*

improvement: an Overview. Sugar Tech 13 (4): 13 (4); 322-335; doi:10.1007/s12355-011-0103-3

Suprasanna, P, Desai NS, Choudhari Rupali S, Bapat VA (2007) RAPD markers for assessing culture induced variation in somatic embryogenesis-derived plants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Sugar Tech 9(4): 284–289

Wending I, Trueman SJ, Xavier A (2014) Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. New Forests 45: 473-486; doi:10.1007/s11056-014-9415-y

Recibido: 08-03-2016
Aceptado: 19-05-2016