

# Caracterización Agroindustrial de Plantas de Probeta de *Saccharum* spp.<sup>1</sup>

G. Velázquez\*, G. Carrillo\*\*

## ABSTRACT

In a sample of plants developed from 200 mature stems, generated from test tube plants *Saccharum* spp., redifferentiated from four month-old culture cells, an analysis was made of 15 phenotypic characteristics in order to determine the level of stability, based on their origin. As to the color of the stem, maturity curve, flowering and susceptibility to *Puccinia melanocephala* Syd., the response of the plants was similar to that of the control plants, when comparing the average values of the two populations. In an analysis of the behavior of the plants, at the level of subplots (20 subplots, with ten rows each), no significant differences were noted with regard to the sprouting of buds, the length of the 3rd leaf, the width of the third half of the 3rd leaf, the first determination of Brix in the field and the sample weight of the eight. The values of the coefficient of variation of the percent of sprouting or clustering of buds, regardless of the populations analyzed, were the highest, as well as the lesions caused by *P. melanocephala*. Given the nature of the information obtained, we feel that micropropagation can be used in conserving the genetic resources of this grass, for the mass multiplication of plants selected for their outstanding characteristics during traditional breeding processes, and for generating transgenic plants with specific modifications, given the increasing possibilities for manipulating biologicals at the molecular and cellular levels.

## COMPENDIO

En una muestra de plantas desarrolladas a partir de 200 tallos maduros generados de plantas de probeta de *Saccharum* spp., rediferenciadas de cultivos de células de cuatro meses de edad, se analizaron 15 características fenotípicas para determinar su grado de estabilidad como consecuencia de su origen. En cuanto al color del tallo, curva de madurez, floración y susceptibilidad a *Puccinia melanocephala* Syd., las plantas se comportaron de manera semejante al testigo, cuando se compararon los valores de la media de las dos poblaciones. En el análisis del comportamiento de las plantas a nivel de sublotos (20 sublotos con 10 surcos cada uno), no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de brotación de yemas, longitud de la hoja 3, ancho del tercio medio de la hoja 3, primera determinación de Brix de campo y peso de muestra de ocho tallos. Los valores del coeficiente de variación del porcentaje de brotación de yemas y de amacollamiento, independientemente de la población de que se trate, fueron de los más altos, así como el de lesiones causadas por *P. melanocephala*. Por la información obtenida, la micropropagación puede ser utilizada en la conservación de los recursos genéticos de esta gramínea, para la multiplicación masiva de plantas seleccionadas por sus características sobresalientes en los procesos de mejoramiento genético tradicionales y para generar plantas transgénicas con modificaciones definidas, dadas las posibilidades que existen cada vez más amplias para manipular, en los niveles molecular y celular, los materiales biológicos.

## INTRODUCCION

**S***accharum officinarum* es un cultivo de importancia industrial, que representa un recurso renovable del que se obtiene, además de sacarosa, otros productos de semejante o mayor valor agregado al del dulce, como el alcohol carburante, aditivos, solventes, proteína celular, material de construcción y otros (3, 12, 13, 14), lo que permite hacer un aprovechamiento integral de recurso.

Esta tendencia se ha impulsado con la creación de programas de diversificación para la utilización del cultivo, lo que ayudará a incrementar los requerimientos de nuevas variedades que se ajusten más específicamente a las necesidades de producción, los cuales podrán satisfacerse con la aplicación de técnicas fundamentales de biotecnología agrícola (16), para acelerar los procedimientos de obtención de nuevas plantas (19, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10); permitir el intercambio de material biológico de manera más segura y eficiente, además de preservar las variedades en óptimas condiciones aplicando sistemas de criopreservación.

El objetivo del presente trabajo fue conocer el grado de estabilidad genética de plantas de probeta de *Saccharum* spp., utilizando como criterio el estudio de quince características fenotípicas determinadas en las plantas obtenidas a partir de 200 tallos de la variedad B4362 cultivadas en el Campo Agrícola Experimental

1 Recibido para publicación el 25 de mayo de 1990.

\* Parte de la Tesis para optar al grado de Maestría en Ciencias; Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. 56230, Méx.

\*\* Profesor Investigador Titular, Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. 56230, Méx.

del Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar (IMPA) en Córdoba, Veracruz. Los doscientos tallos fueron seleccionados de plantas cultivadas hasta madurez fisiológica en el Campo de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Morelos, Zacatepec, Morelos, las cuales fueron rediferenciadas a partir de doscientos cultivos de células rediferenciadas de cuatro meses de edad.

#### MATERIALES Y METODOS

Doscientos tallos maduros de *Saccharum* spp. variedad B4362, desarrollados en el Campo de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Morelos que tuvieron su origen en doscientos cultivos de células rediferenciadas de cuatro meses de edad (4), fueron transportados al Campo Agrícola Experimental del IMPA, en donde fueron sembrados, cada tallo en un surco de 2 m de longitud. Se denominan clones a las plantas de cada surco, por tener su origen en un solo tallo. Cada cinco surcos se intercaló un tallo del cultivar original B4362, obtenido por medios convencionales en el Campo Agrícola Experimental del IMPA, que sumó un total de 48 surcos, utilizados como referencia. La distribución del material en el campo se realizó en forma similar a la "fase surco" del proceso de selección de híbridos del IMPA (8), que permite observar el comportamiento global de las dos poblaciones (plantas propagadas *in vitro* y generadas convencionalmente) y por grupos. Para eso, el lote experimental se dividió en veinte sublotos, sembrándose en cada uno diez surcos de plantas propagadas *in vitro* y cuatro réplicas del cultivar original de referencia.

Las características evaluadas en este trabajo fueron: porcentaje de brotación de yemas (V1), amacollamiento (V2), longitud (cm) de la hoja número 3 (V3), ancho (mm) del tercio medio de la hoja número 3 (V4), número promedio de lesiones de roya (*P. melanocephala*) por centímetro cuadrado (V5), primera (V6), segunda (V7), tercera (V8) y cuarta determinación de Brix de campo (V9), longitud (m) final del tallo (V10), diámetro (cm) final del tallo (V11), peso de muestra de ocho tallos (V12), Brix corregido (V13), pureza del jugo (V14) y porcentaje de sacarosa en jugo (V15). Otras determinaciones fueron: susceptibilidad a la roya, curva de madurez, color del tallo y comportamiento de la floración.

Con el fin de efectuar las observaciones del comportamiento global de cada variable en las dos poblaciones, se calcularon la media aritmética ( $X$ ), desviación estándar ( $S$ ) y coeficiente de variación ( $CV=S/X$ ). A nivel de sublote se realizaron las comparaciones entre

medias y variancias, utilizando la prueba de T para medias y la de F para variancias (20).

El procedimiento de comparación de variancias fue similar al utilizado por Ploper y Mariotti (18) y Miller (17). En este caso, los grados de libertad considerados para el testigo fueron únicamente tres, en cambio para los clones fueron nueve.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

##### Observaciones sobre las quince características estudiadas

Como criterios para evaluar el desarrollo de las plantas propagadas *in vitro* se confrontaron los valores de la media ( $X$ ), desviación estándar ( $S$ ) y el coeficiente de variación fenotípica ( $CV$ ) de quince características agronómicas y de fábrica, de la población del cultivar original B4362 de referencia (48 surcos) y de las plantas de probeta (200 surcos). Al analizar el comportamiento de la media de cada variable se determinó que nueve presentaban valores un poco más altos en la población de referencia. En el carácter de la susceptibilidad a la roya, se detectó una media considerablemente mayor en la población de las plantas de probeta.

Los tallos de las plantas cosechados en Zacatepec, donde las plantas de probeta se desarrollaron, fueron transportados al Campo Agrícola Experimental del IMPA en Córdoba, mientras que las plantas del cultivar original B4362 que se utilizaron como semilla, se obtuvieron en el Campo del IMPA, condición que otorgó cierta ventaja inicial en la población testigo. Aunque, en este caso, sea motivo de discusión la diferente procedencia del material biológico, Ploper y Mariotti (18), y Miller (17), observaron también cierta superioridad en las características analizadas en las plantas de sus poblaciones testigo, en trabajos similares.

Los valores del coeficiente de variación del porcentaje de brotación de yemas (V1) y el de amacollamiento (V2), independientemente de la población de que se trate, fueron de los más altos. En el caso del valor del coeficiente de variación para el amacollamiento, los resultados coinciden con los alcanzados por Ploper, Mariotti (18) y Miller (17), quien trabajó con 606 clones y 29 réplicas del testigo.

Al comparar los cuatro valores de la media de Brix de campo (V6, V7, V8 y V9) de las dos poblaciones, para observar su respectiva tendencia a la madurez, se encontró que las dos curvas son semejantes (Fig. 1).

Las calificaciones sobre susceptibilidad a la roya, demostraron que ningún individuo de las dos

**Cuadro 1. Valores de  $\bar{X}$ , S y CV (%) de 15 características en las poblaciones de 48 réplicas del cultivar original B 4362 y 200 clones obtenidos de plantas de probeta.**

| Carácter | Población | X      | S     | CV %  |
|----------|-----------|--------|-------|-------|
| V1       | Testigo   | 61.47  | 15.95 | 25.95 |
|          | Clones    | 40.10  | 14.83 | 36.98 |
| V2       | Testigo   | 6.45   | 2.26  | 35.04 |
|          | Clones    | 6.76   | 3.61  | 53.40 |
| V3       | Testigo   | 136.65 | 16.30 | 11.93 |
|          | Clones    | 137.25 | 16.02 | 11.67 |
| V4       | Testigo   | 44.67  | 5.98  | 13.39 |
|          | Clones    | 43.45  | 4.95  | 11.39 |
| V5       | Testigo   | 0.38   | 0.13  | 34.21 |
|          | Clones    | 0.48   | 0.16  | 33.33 |
| V6       | Testigo   | 15.66  | 1.35  | 8.62  |
|          | Clones    | 15.75  | 1.12  | 7.17  |
| V7       | Testigo   | 18.31  | 1.03  | 5.63  |
|          | Clones    | 18.34  | 1.10  | 6.00  |
| V8       | Testigo   | 20.81  | 1.03  | 4.95  |
|          | Clones    | 20.77  | 1.10  | 5.30  |
| V9       | Testigo   | 21.89  | 0.98  | 4.48  |
|          | Clones    | 21.57  | 1.13  | 5.34  |
| V10      | Testigo   | 3.15   | 0.20  | 6.35  |
|          | Clones    | 3.10   | 0.13  | 4.19  |
| V11      | Testigo   | 3.50   | 0.33  | 9.43  |
|          | Clones    | 3.31   | 0.35  | 10.57 |
| V12      | Testigo   | 15.61  | 2.75  | 17.62 |
|          | Clones    | 14.15  | 2.40  | 16.96 |
| V13      | Testigo   | 21.90  | 1.59  | 7.26  |
|          | Clones    | 21.51  | 1.69  | 7.86  |
| V14      | Testigo   | 91.60  | 2.05  | 2.24  |
|          | Clones    | 91.40  | 2.64  | 2.89  |
| V15      | Testigo   | 20.09  | 1.81  | 9.01  |
|          | Clones    | 19.68  | 1.96  | 9.96  |

poblaciones estuvo libre de pústulas y, según la escala de calificación del IMPA (8) en la segunda evaluación efectuada, el daño del patógeno se observó en grado 4, el cual es de reacción susceptible.

En relación con el color del tallo, se observó que el verde amarillento característico del cultivar B4362, fue el mismo que presentaron todas las plantas de los clones. De igual manera, en lo que respecta a la

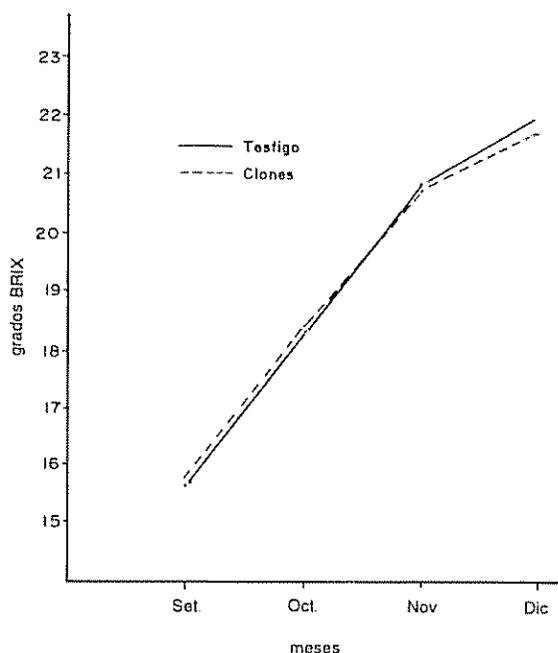


Fig. 1. Madurez del cv. B4362 (testigo) y de los clones con base en grados Brix del refractómetro manual

floración todos los individuos de la población de referencia y de probeta florecieron, en forma profusa y simultánea.

#### Comportamiento de las plantas en el nivel de sublote

Los resultados de la comparación de la media y la variancia del porcentaje de brotación de yemas (V1), longitud (cm) de la hoja número 3 (V3), ancho (mm)

del tercio medio de la hoja número 3 (V4), primera determinación de Brix de campo (V6) y peso de muestra de ocho tallos (V12) de cada sublote, indican que no existe diferencia significativa en los sublotes de los clones de probeta.

En el Cuadro 2 se anotan las variables en que se detectaron ciertas diferencias significativas de los valores de la media o la variancia en los clones de probeta, al analizar los veinte sublotes. Según se observa, en el caso de la media, únicamente en tres variables se encontraron diferencias significativas en los clones. Respecto de las variancias, en las diez variables indicadas, se determinaron ciertas diferencias significativas en los clones de probeta. El amacollamiento (V2) presentó un mayor número de sublotes valores de variancia mayores para los clones. En las plantas de los sublotes 10, 14 y 15 se encontraron más características con diferencias significativas.

Un análisis de las posibles causas de que existan las diferencias significativas entre medias o variancias en los sublotes señalados para las diez variables, se presenta a continuación:

Al comparar los valores de la media (Cuadro 3), se presentó un porcentaje muy bajo de casos en los que se observaron valores ligeramente mayores, pero significativos en las características V8, V11 y V14 de los clones de probeta, que les daría cierta superioridad desde el punto de vista de selección. Sin embargo, esto ocurrió en tres caracteres y un sublote, diferente para cada carácter, en cuyo caso el testigo denotó la variancia mayor. Si se considera que la variancia de la población de referencia es un indicador de la variación dada por la interacción de la planta con el ambiente, los cambios en los valores de la variancia de los clones

Cuadro 2. Identificación de las características en que se detectaron diferencias estadísticas significativas (X) en los valores de media y variancia.

| Variable | Media | Número de sublote | Variancia | Número de sublote |
|----------|-------|-------------------|-----------|-------------------|
| V1       |       |                   | X         | 9,10,15,18,20     |
| V5       |       |                   | X         | 7,9,10            |
| V7       |       |                   | X         | 19                |
| V8       | X     | 16                | X         | 3                 |
| V9       |       |                   | X         | 6,10,14           |
| V10      |       |                   | X         | 8,12,13           |
| V11      | X     | 1                 | X         | 5                 |
| V13      |       |                   | X         | 14,15,16          |
| V14      | X     | 11                | X         | 14,15             |
| V15      |       |                   | X         | 15,16,18          |

podrían indicar otra posible fuente de variación. Los resultados de este análisis señalan que aun cuando estadísticamente se interpretan estos valores como significativos, no existe mucha congruencia en ellos porque no se observa la misma tendencia en los valores de las variables relacionadas y en el mismo subote. Por ejemplo, en la segunda, tercera y cuarta determinación de Brix de campo (V7, V8 y V9), en los datos que se muestran en el Cuadro 4, se observan diferencias significativas en los sublotes 19 (V7), 3 (V8) y 6, 10 y 14 (V9), todos diferentes.

Un hecho que pudo ocasionar alteración en los resultados fue el problema del acame, que se presentó cuando se hacían las determinaciones de la longitud y diámetro final del tallo (V10 y V11), los muestreos de tallos para obtener los cálculos de Brix corregido (V13), el porcentaje de pureza del jugo (V14) y el porcentaje de sacarosa en jugo (V15).

Las características V1, V2 y V5 presentaron las estimaciones de coeficiente de variación más altos; al respecto es importante mencionar que el menor grado de brotación (V1), observado en los clones, determinó que en un mayor número de sublotes el valor de la variancia sea mayor para el caso de amacollamiento (V2), situación que puede atribuirse a que los tallos sufrieron cierto deterioro al ser transportados de la localidad de Zacatepec a Córdoba y que las plantas se desarrollaron en ambientes diferentes. Para la determinación de lesiones de *P. melanocephala* se utilizó siempre la hoja 3 de dos plantas por surco tomadas al azar, haciendo observaciones en áreas de 1 cm<sup>2</sup> en cada uno de los tres tercios en que se dividió la lámina foliar. Este sistema de muestreo utilizado rutinariamente es muy poco preciso, porque si bien el hongo afecta las plantas, existen grandes diferencias de planta a planta y de región a región de la hoja.

Los resultados coinciden con los obtenidos por Kresovich *et al.* (11), quienes detectaron la pobre variación obtenida en sus materiales por lo que señalaron que el cultivo de tejidos, como fuente de variación, tiene una estimación muy limitada en programas de mejoramiento genético en caña de azúcar. Tew concluye (21), al hacer un análisis sobre las posibles fuentes de variación genética al aplicar procesos biotecnológicos con fines de selección, que, hasta el momento, no se puede hablar de un clon comercial de caña de azúcar logrado por cultivo de tejidos, lo cual muestra el grado de estabilidad del genoma de la célula de *Saccharum* spp.

El origen de la variación de las plantas regeneradas, a partir de las células somáticas cultivadas en estado indiferenciado *in vitro* durante cuatro meses, muy probablemente se deba a la existencia de estirpes celulares (mosaico), en la población de células que conformaban el tejido utilizado para establecer esos cultivos y, en menor grado, a las posibles mutaciones espontáneas dadas durante el periodo de cultivo de las células (aproximadamente unas 60 generaciones de células), por el nivel de ploidía. Este nivel de variación puede verse reflejado a nivel de la planta. En la población de aproximadamente 13 000 plantas estudiadas, provenientes de la muestra de 200 tallos en el que cada uno se desarrolló a partir de un explante diferente, no se detectaron grandes cambios, lo que puede atribuirse a la escasa variación y al posible origen multicelular de las plantas de probeta.

### CONCLUSIONES

Dada la naturaleza de los resultados obtenidos en la presente investigación, que concuerdan con los de Kresovich (11) y Tew (21), se puede concluir que, al menos en las condiciones experimentales indicadas, las

**Cuadro 3. Variancias y comparación de medias en los caracteres y sublotes en que hubo diferencias significativas a favor de los clones (se incluyen las variancias correspondientes).**

| Carácter | Sublote | Población | Variancia (S <sup>2</sup> ) | Media (X) | Prueba de t |
|----------|---------|-----------|-----------------------------|-----------|-------------|
| V1       | 16      | Testigo   | 0.58                        | 21.13     | 2.23*       |
|          |         | Clones    | 0.16                        | 21.18     |             |
| V11      | 1       | Testigo   | 0.06                        | 3.15      | 2.94*       |
|          |         | Clones    | 0.02                        | 3.45      |             |
| V14      | 11      | Testigo   | 3.53                        | 91.21     | 2.52*       |
|          |         | Clones    | 0.39                        | 92.82     |             |

\* Significancia al 0.05 de probabilidad

Cuadro 4. Comparación de variancias en los caracteres y sublotes en que hubo diferencias significativas a favor de los clones, incluyendo como referencia la variancia promedio de los 20 sublotes.

| Carácter | Población | S <sup>2</sup> promedio en<br>20 sublotes |        | Sublotes, variancias (S <sup>2</sup> ) y prueba de F. |        |         |        |        |      |        |       |
|----------|-----------|---|--------|---|--------|---------|--------|--------|------|--------|-------|
|          |           |   |        | 9   | 10     | 15      | 18     | 20     |      |        |       |
| V2       | Testigo   | 4.15                                      | 0.17   |   | 0.24   |         | 2.21   |        | 0.58 |        | 1.87  |
|          | Clones    | 11.85                                     | 48.58  | 285.76*   | 10.87  | 45.29*  | 45.67  | 20.67* | 5.99 | 20.33* | 51.80 |
| V5       | Testigo   | 0.0119                                    | 0.0006 |   | 0.0028 |         | 0.0014 |        |      |        |       |
|          | Clones    | 0.0145                                    | 0.0054 | 9.00*   | 0.0306 | 10.93*  | 0.0162 | 11.57* |      |        |       |
| V7       | Testigo   | 0.84                                      | 0.04   |   |        |         |        |        |      |        |       |
|          | Clones    | 0.72                                      | 0.55   | 13.75*  |        |         |        |        |      |        |       |
| V8       | Testigo   | 0.73                                      | 0.17   |   |        |         |        |        |      |        |       |
|          | Clones    | 0.93                                      | 2.73   | 16.06*  |        |         |        |        |      |        |       |
| V9       | Testigo   | 0.90                                      | 0.10   |   | 0.32   |         | 0.06   |        |      |        |       |
|          | Clones    | 1.07                                      | 1.60   | 16.00*  | 3.27   | 10.22*  | 0.86   | 14.33* |      |        |       |
| V10      | Testigo   | 0.0257                                    | 0.0012 |   | 0.0003 |         | 0.0003 |        |      |        |       |
|          | Clones    | 0.0176                                    | 0.0921 | 76.75*  | 0.0468 | 156.00* | 0.0033 | 11.00* |      |        |       |
| V11      | Testigo   | 0.09                                      | 0.01   |   |        |         |        |        |      |        |       |
|          | Clones    | 0.11                                      | 0.19   | 19.00*  |        |         |        |        |      |        |       |
| V13      | Testigo   | 1.91                                      | 0.27   |   | 0.17   |         | 0.07   |        |      |        |       |
|          | Clones    | 1.84                                      | 3.74   | 13.85*  | 3.44   | 20.23*  | 0.66   | 9.43*  |      |        |       |
| V14      | Testigo   | 3.86                                      | 0.69   |   | 0.57   |         |        |        |      |        |       |
|          | Clones    | 5.58                                      | 15.19  | 22.01*  | 8.53   | 14.96*  |        |        |      |        |       |
| V15      | Testigo   | 2.61                                      | 0.41   |   | 0.05   |         | 0.12   |        |      |        |       |
|          | Clones    | 2.56                                      | 4.83   | 11.78*  | 0.90   | 18.00*  | 1.86   | 15.50* |      |        |       |

\* Significancia al 0.05 de probabilidad.

plantas de probeta son similares a las conseguidas por semilla comercial y, por lo tanto, este sistema de propagación puede ser utilizado en los procesos de selección de híbridos, para la multiplicación de

variedades preseleccionadas, prometedoras y en propagación intensiva. La conservación de variedades en bancos *in vitro* es otra aplicación interesante de este sistema de propagación.

## LITERATURA CITADA

1. AN, G.; COSTA, M.A.; MIIRA, A.; HA, S.B.; MARTON, L. 1988. Organ-specific and developmental regulation of the nopaline synthase promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 88:547-552.
2. CHEN, H.; GARILAND, W.K.M.A.; DAVEY, M.R.; SOTAK, R.; GARTLAND, J.S.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. 1982. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. *Plant Cell Reports* 6:297-301.
3. CLARKE, M.A. 1984. Future research in the sugar industry. *Sugar y Azúcar* 79(10):38-39.
4. COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. 1987. Gene transfer in cereals. *Science* 236:1259-1262.
5. FREY, N.M. 1988. An industry perspective on the benefits of and regulation of genetically engineered plants. *Journal of the Iowa Academy of Science* 95:24-26.
6. HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; STACHEL, S.; WIONANS, S.C.; NESTER, E.W.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. 1968. Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 83:2571-2575.
7. HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; HOFFMAN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
8. IMPA (INSTITUTO PARA EL MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCION DE AZUCAR). 1983. Programa de variedades: Objetivos, importancia y metodología experimental. Córdoba, Méx., Centro Nacional de Investigaciones Azucareras.
9. KEESE, R.A. 1988. Impact of biotechnology on agriculture productivity. *Journal of the Iowa Academy of Science* 95:19-23.
10. KLEE, H.J.; YANOFSKY, M.F.; NESTER, E.W. 1985. Vectors for transformation of higher plants. *Biotechnology* 3:637-642.
11. KRESOVICH, S.; MCGEE, R.E.; DRAWE, H.G.; RIVERA, J.L. 1986. Variability of agronomic characters in populations of tissue culture-derived and vegetatively-propagated sugarcane. *In Congress International Society of Sugar Cane Technology (19). Proceedings. Indonesia.* p. 528-532.
12. LEFFINGWELL, R.J. 1985. Facts about sugar: New York reports. *Sugar y Azúcar* 80(3):4-5.
13. MAZZONE, J.S. 1985. Facts about sugar: Brazil exports high test molasses to the United States. *Sugar y Azúcar* 80(4):10-12.
14. MAZZONE, J.S. 1985. Facts about sugar: Brazil wants to increase alcohol exports to USA. *Sugar y Azúcar* 80(3):8.
15. MENDEZ, S.R.; CARRILLO-CASTAÑEDA, G. 1986. Cultivo *in vitro* de *Saccharum officinarum* L.: Influencia del estado de desdiferenciación sobre la potencialidad de rediferenciación. *Agrociencia* 65:147-151.
16. MILLIN, B.J. 1985. The genetic manipulation of crop plants. *In Molecular Biology and Biotechnology*. J.M. Walker, E.B. Gingold (Eds.). London, The Royal Society of Chemistry. 135 p.
17. MILLER, J.D. 1982. Varieties and breeding. *In Inter-American Sugar Cane Seminar (3)*. Miami, Florida International University. p. 252-256.
18. PLOPER, D.L.; MARIOTTI, J.A. 1978. Variabilidad en subclones obtenidos de cultivos de tejidos en caña de azúcar. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 55:59-64.
19. SCHELL, J. 1987. Transgenic plants as tools to study the molecular organization of plant genes. *Science* 237:1176-1183.
20. SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. 1980. *Métodos estadísticos*. México, Compañía Editorial Continental. 703 p.
21. TEW, I.L. 1989. Biotecnología en evaluación de germoplasma y en mejoramiento genético de caña de azúcar. *Boletín GEPLACÉA* 6(6):1-4.