



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

### VARIACIÓN SOMACLONAL DURANTE LA MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.) EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL

EDUARDO MARTÍNEZ ESTRADA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

ENERO, 2017

La presente tesis, titulada: **Variación somaclonal durante la micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en biorreactores de inmersión temporal**, realizada por el alumno: **Eduardo Martínez Estrada**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



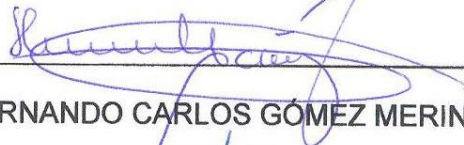
DR. VICTORINO MORALES RAMOS

DIRECTOR:



DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

ASESOR:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR:



DR. JOSAFHAT SALINAS RUIZ

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, enero 2017

## RESUMEN

La variación somaclonal se refiere a los cambios genéticos y epigenéticos en plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Por medio de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), en este estudio se analizó la variación somaclonal durante la propagación *in vitro* de caña de azúcar utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). Se establecieron ápices del cultivar Mex 69-290 y fueron multiplicados por 10 subcultivos en medio Murashige y Skoog suplementado con con 3 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina, 0.65 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético y 0.3 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina en BIT. Después de 35 días en cada subcultivo, se registró el número y longitud de brotes por explante. Para el análisis molecular se tomaron 10 de plantas por cada subcultivo, obteniendo un total de 109 bandas a partir de 10 iniciadores ISSR. Mediante una matriz de distancias genéticas de Nei, y empleando el método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA), se obtuvo un dendrograma de distancias genéticas. Los resultados obtenidos muestran que la producción de brotes de caña de azúcar tiende a incrementarse hasta el subcultivo ocho, mientras que longitud de brotes disminuye. Los marcadores ISSR demostraron la existencia de variación somaclonal durante la micropropagación de caña de azúcar. Los subcultivos con mayor porcentaje de polimorfismo (%P) y distancias genéticas (DG) fueron el 1º, 9º y 10º, con 10.1, 15.6 y 10.1 %P y 0.0222, 0.0181 y 0.0181 DG, respectivamente. El análisis molecular y estadístico demostró que el establecimiento *in vitro* y el número de subcultivos son factores que afectan la proporción de variación somaclonal durante la micropropagación de caña de azúcar utilizando BIT.

## ABSTRACT

Somaclonal variation refers to the genetic and epigenetic changes in plants regenerated from *in-vitro* plant tissue culture. By ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) molecular markers, in this study, the somaclonal variation during *in vitro* propagation of sugarcane using Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) was evaluated. Apices of the cultivar Mex 69-290 were established and multiplied by 10 subcultures in Murashige and Skoog medium supplemented with 3 g L<sup>-1</sup> sucrose, 1 mg L<sup>-1</sup> kinetin, 0.65 mg L<sup>-1</sup> indoleacetic acid and 0.3 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine in TIBs. After 35 days in each subculture, the number and length of shoots per explant were recorded. For the molecular analysis 10 plants were taken per subculture, obtaining a total of 109 bands from 10 ISSR primers. A dendrogram of genetic distances was obtained using a matrix of Nei's genetic distances and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The results obtained show that the production of sugarcane shoots tends to increase until subculture eight, while shoot length decreases. ISSR markers showed the existence of somaclonal variation during micropropagation of sugarcane. The subcultures with the highest percentage of polymorphism (%P) and genetic distances (GD) were the 1°, 9° and 10° (with 10.1, 15.6 and 10.1 %P and 0.0222, 0.0181 and 0.0181 (GD) respectively). The molecular and statistical analysis showed that *in vitro* establishment and the number of subcultures are factors that affect the frequency of somaclonal variation during the micropropagation of sugarcane using TIBs.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación y, en general, toda esta etapa en el Colegio de Postgraduados, no hubiese sido posible sin la ayuda de innumerables personas e instituciones que, de alguna u otra manera, permitieron que este ciclo superara todas mis expectativas.

***Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT):*** Por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias.

***A mi consejo particular:*** Dr. Victorino Morales Ramos, Dr. Fernando Carlos Gómez Merino y Dr. Josafhat Salinas Ruíz, por la disposición y apoyo a esta investigación. Gracias a todos sus consejos y sugerencias para lograr concluir este ciclo.

***Al Dr. Jericó Bello Bello.*** Por la confianza que me tuvo (y tiene) desde hace años, no alcanzan las palabras para agradecer todo lo que ha hecho por mí. De verdad Muchas gracias.

***A mi familia.*** Por el apoyo incondicional que siempre me han dado sin importar las decisiones que tome, aún cuando éstas nos mantengan alejados (geográficamente, aclaro) desde hace algunos años. Obviamente de no ser por ustedes, nada de esto sería posible.

***A Katita.*** Gracias por estar conmigo en las buenas y sobre todo en las malas, si estos años han sido increíbles, en gran parte te lo debo a tí. Muchísimas, muchísimas gracias.

***A la Maestra Miriam Pastelín:*** Por su amistad y ayuda brindada durante mi estancia en la maestría y por las facilidades para trabajar en la Facultad de Ciencias Químicas.

***A Samantha:*** Por tu amistad y ayuda para terminar el trabajo de biología molecular.

***A mis compañeros y amigos del laboratorio de cultivo de tejidos:*** Jose Luis, Michi, Celia, Jaime, Sandra y sin fin de personas que nos han acompañado durante estos años en el laboratorio, por compartir experiencias y conocimientos.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
LISTA DE CUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.1 Objetivos particulares .....	3
III. HIPÓTESIS GENERAL.....	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 Caña de azúcar .....	5
4.1.1 Descripción taxonómica .....	5
4.1.2 Importancia económica.....	5
4.2 Cultivo de Tejidos Vegetales .....	6
4.3 Micropropagación .....	7
4.4 Micropropagación de caña de azúcar .....	9
4.5 Sistemas de Inmersión Temporal.....	11
4.6 Micropropagación de Caña de Azúcar en SIT.....	13
4.7 Variación Somaclonal .....	14
4.8 Causas de la variación somaclonal .....	14
4.9 Métodos de detección de la variación somaclonal.....	17
4.10 Marcadores ISSR.....	17
4.11 Variación somaclonal en caña de azúcar .....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Material vegetal y establecimiento <i>in vitro</i> .....	19
5.2 Micropropagación de caña de azúcar en Biorreactores de Inmersión Temporal.....	20
5.3 Diseño Experimental y Análisis estadístico .....	20
5.4 Análisis de la variación somaclonal .....	21
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6.1 Efecto del número de subcultivo sobre el número y longitud de brotes .....	24
6.2 Efecto del número de subcultivo sobre la variación somaclonal de caña de azúcar.....	27

VII.	CONCLUSIONES .....	31
VIII.	LITERATURA CITADA.....	32

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Características de los iniciadores ISSR evaluados. ....	22
<b>Cuadro 2.</b>	Efecto del subcultivo sobre el porcentaje de polimorfismo durante la micropropagación de caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal detectado mediante marcadores ISSR.....	27

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Efecto del número de subcultivo sobre el número de brotes de caña de azúcar cv. Mex 69-290 utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal. a-j) subcultivo uno a diez, respectivamente. Línea: 1 cm.....	24
<b>Figura 2.</b>	Efecto del número de subcultivo sobre el número (A) y longitud (cm) de brotes (B) de caña de azúcar cv. Mex 69-290 utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal. Valores seguidos por diferente letra denotan diferencias estadísticas significativas (LS-Means, $P < 0.05$ ). ....	26
<b>Figura 3.</b>	Perfiles de bandeo ISSR en gel de agarosa al 3 % de diez plantas del mismo subcultivo, respecto a la planta donante. a) Subcultivo uno, iniciador UBC 809; b) Subcultivo 7, iniciador UBC 826; y c) Subcultivo nueve, iniciador UBC 826. M: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases y D: Planta donante.....	28
<b>Figura 4.</b>	Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei, calculadas para cada subcultivo respecto a la planta donante.....	29

## I. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a su alta capacidad de almacenar sacarosa en sus tallos (Sentfies-Herrera *et al.*, 2014). Su cultivo contribuye con el 75% de la producción mundial de azúcar. Por su adaptación a condiciones ambientales tropicales y subtropicales, es considerado como una biofábrica con potencial para la producción de nuevos productos de alto valor industrial (Pandey *et al.*, 2011). En México, el sistema de producción de la caña de azúcar genera más de dos millones de empleos, tanto en forma directa como indirecta, y se desarrolla en 51 ingenios en 15 entidades federativas, siendo Veracruz el mayor productor (Enriquez-Poy, 2013; CONADESUCA, 2016). A pesar de la importancia de este cultivo, existen problemas relacionados con rezagos en los procesos productivos, como son: la falta de nuevos cultivares y escasos de material vegetal certificado para la renovación de plantaciones comerciales. En este sentido, la producción convencional de plántulas libres de plagas y enfermedades requeridas para la siembra es lenta, laboriosa y requiere una cantidad sustancial de caña triturable que de otro modo podría ser utilizada para la producción de azúcar (Pandey *et al.*, 2011). Como respuesta a esta problemática, la micropropagación o clonación *in vitro* permite la obtención masiva de material vegetal rejuvenecido con alta calidad genética y fitosanitaria bajo condiciones asépticas y controladas. La micropropagación convencional en medio semisólido ha sido ampliamente reportada (Lakshmanan *et al.*, 2005; Sahoo *et al.*, 2011; Kaur and Sandhu, 2015) y, actualmente, se han desarrollado protocolos exitosos en sistemas de inmersión temporal que han permitido incrementar la eficiencia biológica, reducir costos y mano de obra durante el proceso (Lorenzo *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.* 2003; Mordocco *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque la micropropagación es un método de propagación asexual, en el cual se espera que la integridad genética del donante se conserve en la progenie (Lal, *et al.*, 2015), se ha observado inestabilidad fenotípica y genotípica en especies



micropropagadas (Osipova *et al.*, 2011; Soliman *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2016). Este fenómeno ha sido denominado variación somaclonal y fue descrito por Larkin y Scowcroft (1981) como cualquier tipo de variación genética detectado en plantas derivadas de cultivo *in vitro*. De acuerdo a Kaepler *et al.* (2000), los cambios epigenéticos también son considerados variaciones somaclonales. Esta variación durante los procesos de micropropagación es indeseable, especialmente en la producción comercial donde se requiere mantener la homogeneidad genética y agronómica de los individuos seleccionados (Lakshmanan *et al.*, 2005; Landey *et al.*, 2013). Aunque las causas de la variación somaclonal no han sido completamente aclaradas (Bairu *et al.*, 2011) parecen ser el resultado tanto de la variación genética pre-existente dentro de los explantes como de la variación inducida durante la fase de cultivo de tejidos, siendo el número de subcultivos un factor importante (Jian, 2001). La frecuencia de variación somaclonal puede detectarse con marcadores fenotípicos, bioquímicos y moleculares (Bairu *et al.*, 2011), destacando estos últimos por su habilidad para detectar variaciones en las regiones codificantes y no codificantes del ADN, además de que no son influenciados por el ambiente ni por los estadios fenológicos de las plantas. Dentro de los diversos tipos de marcadores moleculares, destacan los ISSR (Inter Single Sequence Repeat o intermicrosatélites) por ser marcadores multiloci que no requieren conocimiento previo del genoma, su ensayo es rápido, simple, de bajo costo y han sido utilizados para estudiar la variación somaclonal en diversas especies como algodón (Jin *et al.*, 2008), chile habanero (Bello-Bello *et al.*, 2014) y olivo (Bradaï *et al.*, 2016). El objetivo de esta investigación fue estudiar la variación somaclonal durante la micropropagación de caña de azúcar utilizando marcadores moleculares ISSR.

## II. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la variación somaclonal durante la micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) utilizando marcadores moleculares ISSR.

### 2.1 Objetivos particulares

Identificar la tasa de multiplicación de caña de azúcar durante diez ciclos de cultivo en biorreactores de inmersión temporal.

Analizar la variación somaclonal de caña de azúcar durante diez ciclos de cultivo utilizando marcadores moleculares ISSR.

### **III. HIPÓTESIS GENERAL**

Al aumentar el número de subcultivos en la micropropagación de caña de azúcar, aumenta también la proporción de variación somaclonal, encontrándose un efecto negativo en la cantidad y longitud de brotes producidos por explante.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Caña de azúcar

#### 4.1.1 Descripción taxonómica

La caña de azúcar es un cultivo perenne monocotiledóneo y alógamo perteneciente al género *Saccharum* de la familia Poaceae. La taxonomía y nomenclatura del género ha variado constantemente (Carneiro *et al.*, 2016). Los cultivares modernos de caña de azúcar son el resultado de la combinación de diversas especies poliploides del género *Saccharum* (Gómez-Merino *et al.*, 2014). De acuerdo con Daniels y Roach (1987), el género comprende seis especies: *S. barberi*, *S. edule*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense*, y *S. spontaneum*. De ellas *S. officinarum* y *S. spontaneum* parecen ser los ancestros de la caña comercialmente cultivada en la actualidad, con el 80-90% del genoma *S. officinarum* y 10-20% del genoma de *S. spontaneum* (Hoarau *et al.* 2002).

#### 4.1.2 Importancia económica

La caña de azúcar es una fuente de insumos para la industria alimenticia y de bioenergías de relevante importancia para diversos países en los trópicos y subtropicos (Moore *et al.*, 2013; Hsie *et al.*, 2015). Su cultivo abarca más de 27 millones de hectáreas en más de 130 países y territorios con una producción mundial superior a 1,884 millones de toneladas (FAOSTAT, 2016). Brasil es el líder con una producción anual de 737 mil millones de toneladas de caña en fresco, seguido de India, China, Tailandia, Pakistán y México (FAOSTAT, 2016). La importancia económica de la caña de azúcar se debe principalmente a tres grandes atributos: Es altamente productiva; utiliza eficientemente los insumos agrícolas (como agua, fertilizantes, pesticidas y mano de obra); y puede ser procesada localmente en productos de alto valor agregado como azúcar, melazas y etanol, entre otras (Moore *et al.*, 2013). En México, el sistema de producción de la caña de azúcar genera más de 930 mil empleos directos, 2.2 millones de empleos indirectos, y se desarrolla en 15 entidades federativas, siendo Veracruz el mayor productor

(Enriquez-Poy, 2013). La zafra 2014-2015 se realizó en 51 ingenios azucareros en una superficie de 783,515 ha, alcanzando una producción de 5,984,961 toneladas de azúcar (CONADESUCA, 2016), posicionándose como el segundo cultivo económicamente importante a nivel nacional después del maíz (SIAP, 2016).

A pesar de la importancia de este cultivo, existen problemas relacionados con rezagos en los procesos productivos, entre ellos, la falta de nuevos cultivares y escasos de semilleros certificados (Sentíes-Herrera *et al.*, 2014). Usualmente este cultivo es propagado de manera asexual debido a que su floración, al ser controlada por diversos factores como fotoperiodo, temperatura y madurez, se encuentra restringida a regiones específicas (Babu, 1990), además de que las plantas generadas por semillas resultan en poblaciones heterogéneas (Baucum *et al.*, 2002). Por otro lado, el mayor problema con la propagación vegetativa es la limitada tasa de multiplicación que retrasa la adopción de nuevos cultivares (Kaur y Sandhu, 2015). En términos de materiales genéticos, en México la generación de cultivares ha mostrado una caída en los últimos 30 años, y la producción actual de caña de azúcar se sustenta en solo tres cultivares que se cultivan en 70% de la superficie nacional siendo CP 72-2086 (36%), Mex 69-290 (29%) y Mex 79-431 (9%) los mayormente utilizados (Sentíes-Herrera *et al.*, 2014). Aunado a ello, la falta de material vegetativo certificado ha propiciado la escasa renovación de las plantaciones comerciales, provocando la pérdida de la capacidad de regeneración, que se ve reflejado en los bajos rendimientos en campo (Flores, 2007). Ante esta situación, la micropropagación, basado en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, emerge como una alternativa para la producción masiva de plántulas genéticamente homogéneas y libres de enfermedades.

#### **4.2 Cultivo de Tejidos Vegetales**

Se le llama cultivo de tejidos vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999; Thorpe, 2007).

El primer reporte acerca del CTV se remonta a los experimentos realizados por Gottlieb Haberlandt, donde se estableció el concepto que rige al cultivo *in vitro*, la “totipotencialidad” de las células vegetales (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999). Éste, hace referencia a que cualquier célula vegetal tiene la información necesaria para originar otra genéticamente idéntica que, después de subsecuentes procesos de división y diferenciación, puedan convertirse en tejidos, órganos o individuos completos.

El CTV es una herramienta muy valiosa para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica y genética, y por otro lado tiene una importante aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación de diversas especies vegetales (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999), donde el rápido crecimiento y multiplicación de las plantas, así como la posibilidad de eliminar plagas y enfermedades de los cultivos, son algunas de sus principales ventajas (Winkelmann *et al.*, 2006).

### **4.3 Micropropagación**

Se le llama micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando técnicas de CTV (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999); donde a partir de un pequeño fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Esta técnica, que permite la rápida propagación masiva de genotipos seleccionados, se ha convertido en una herramienta muy valiosa para la propagación de especies que convencionalmente son difíciles de propagar por semillas o su propagación vegetativa es poco eficiente (Singh y Shetty, 2011). De acuerdo con Pérez-MolpheBalch *et al.* (1999), las principales ventajas que tiene la micropropagación sobre la propagación convencional son:

- Se trata de un sistema clonal, es decir, que las plantas obtenidas son genéticamente idénticas al donante.

- Debido a que los procesos se llevan a cabo bajo condiciones controladas, es un sistema completamente independiente de las condiciones externas, por lo que no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas u otros factores ambientales.
- El número de plantas que se puede obtener es, por su naturaleza, ilimitado. Siendo la única limitante la capacidad misma del laboratorio.
- El espacio que se requiere es mínimo y el tiempo en que se realiza el proceso es relativamente corto.
- Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos, e incluso de virus y viroides si se utilizan técnicas de saneamiento adecuadas. Permitiendo con ello, transportar fácilmente material vegetal entre países debido a las menores restricciones fitosanitarias.

En los procesos de micropropagación pueden identificarse cinco etapas bien definidas: fase 0, selección de explante; fase I, establecimiento de los cultivos *in vitro*; fase II, multiplicación o proliferación; fase III, elongación y enraizamiento y fase IV, aclimatización (Sharma *et al.*, 2016).

#### ***Etapa 0: Selección del explante***

Cualquier parte de una planta (meristemos, ápices, yemas axilares, semillas, etc.) que posea la habilidad de regenerar *in vitro* puede ser utilizada como explante (Sharma *et al.*, 2016). El explante se elegirá dependiendo la respuesta y vía de regeneración a utilizar.

#### ***Etapa I: Establecimiento de los cultivos in vitro***

Es la etapa en la que se realiza la inoculación de los explantes en los medios de cultivo, después de haberlos sometido a un proceso de desinfección superficial. Dicho proceso usualmente se realiza utilizando diversos compuestos que permitan aminorar la contaminación de los explantes. Los más utilizados son el hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, etanol y cloruro de mercurio. Finalmente, los cultivos son incubados bajo condiciones ambientales controladas (Sharma *et al.*, 2016)

### ***Etapa II: Multiplicación o proliferación***

Es considerada la etapa más importante del proceso donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas. El objetivo de esta fase es la producción del mayor número de brotes posible a partir de los propágulos establecidos. En esta etapa los brotes son separados en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medio fresco para inducir nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseadas (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999).

### ***Etapa III: Elongación y enraizamiento***

Durante esta etapa, los brotes crecen hasta desarrollar un sistema radical y la altura adecuada que les permita ser transferidos a un sustrato en condiciones de invernadero para su aclimatización. Generalmente en esta fase es necesario la adición de auxinas o giberelinas. El rol de las auxinas es promover la formación de raíces. Las giberelinas promueven la elongación de las plántulas. Estos reguladores del desarrollo pueden ser utilizados de forma individual o en combinación (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999).

### ***Etapa IV: Aclimatización***

Consiste en transferir las plántulas obtenidas a condiciones *ex vitro*. El objetivo de esta fase es lograr la sobrevivencia de las plantas al momento del trasplante y el inicio del crecimiento *ex vitro*. Durante esta etapa se produce un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales, después de las etapas *in vitro*. La eficiencia en la aclimatización es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta dependerá en gran medida la eficiencia total del proceso y la calidad final de las plantas. Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campo, vivero o invernadero (Caamal-Velazquez y Bello-Bello, 2014).

## **4.4 Micropropagación de caña de azúcar**



Desde la publicación del primer trabajo acerca de la inducción de callos, realizado por Nickell (1964), el cultivo de tejidos de caña ha sido una herramienta valiosa para diversas actividades científicas. Años más tarde Barba y Nickell (1969) y Heinz y Mee (1971) publicaron de manera independiente los primeros reportes sobre la obtención de plántulas regeneradas a partir de callos, dando inicio al desarrollo de aplicaciones del CTV, tales como la micropropagación, mejoramiento genético, conservación de germoplasma (Taylor y Dukic, 1993), eliminación de patógenos sistémicos (Wagih *et al.*, 1995; Parmessur *et al.*, 2002) e ingeniería genética de caña de azúcar (Bower y Birch, 1992; Arencibia *et al.*, 1995).

La utilización de la micropropagación para la multiplicación rápida de caña de azúcar se ha enfatizado durante los últimos años (Sawant *et al.*, 2014). Esta técnica permite obtener material vegetal de mejor calidad para nuevas plantaciones, en comparación con la propagación convencional (Tiwari *et al.*, 2011). Surgiendo, además, como una herramienta poderosa para acelerar los programas de multiplicación de nuevos cultivares (Snyman *et al.*, 2011; Sawant *et al.*, 2014), rejuvenecimiento de cultivares deteriorados y la facilitación de transporte de material vegetal (Lal *et al.*, 2015); así como el aumento en la productividad en campo (hasta en un 25%) y el rendimiento en azúcar (Sawant *et al.*, 2014). Estas ventajas han permitido la explotación comercial de la micropropagación en la industria azucarera a nivel mundial (Pandey *et al.*, 2011).

La micropropagación de caña de azúcar puede realizarse mediante organogénesis y embriogénesis somática. En ambos casos abundan los reportes de protocolos exitosos (Snyman *et al.*, 2011). En esta especie, la organogénesis directa involucra la regeneración directa de brotes a partir de meristemas apicales (Pathak *et al.*, 2009; Sandhu *et al.*, 2009; Ramgareeb *et al.*, 2010) u hojas inmaduras (Lakshmanan *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2007), con la utilización de al menos una citocinina y una auxina, en una proporción mayor de citocininas que auxinas. Seguido del proceso de regeneración, el enraizamiento de los brotes obtenidos se logra mediante la adición de auxinas en el medio de cultivo (Ali *et al.*, 2008) o removiendo los reguladores de crecimiento del medio (Lakshmanan *et al.*, 2006) y la adición de altas

concentraciones de azúcar (Singh *et al.*, 2006). Por otra parte, también se ha reportado la organogénesis indirecta a partir de meristemas, pasando por una etapa de tejido calloso (García *et al.*, 2007; Behera y Sahoo, 2009). La producción de embriones, vía embriogénesis somática indirecta es inducida mediante la utilización de auxinas, en especial de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4-D, Franklin *et al.*, 2006; Behera y Sahoo, 2009). Una vez que los embriones son inducidos, suelen germinar sin la necesidad de adicionar reguladores del crecimiento (Ali *et al.*, 2007), aunque en algunos cultivares se utiliza ácido 1-naftalenacético (ANA) o kinetina (KIN) para la estimulación de este proceso (Gill *et al.*, 2002).

A pesar de las ventajas que ofrece la micropropagación de caña de azúcar, respecto a la propagación convencional, esta técnica aún tiene complicaciones que limitan su adopción a nivel mundial, como los altos costos de producción y variación genética en algunas poblaciones obtenidas mediante cultivo de tejidos (Lal *et al.*, 2015).

#### **4.5 Sistemas de Inmersión Temporal**

Los métodos convencionales de micropropagación requieren de un gran número de recipientes de cultivo, medios con agentes gelificantes y una gran cantidad de mano de obra para la división de los cultivos obtenidos (Etienne y Berthouly, 2002), limitando y encareciendo la adopción de esta tecnología a nivel industrial. Para contrarrestar estos problemas, la micropropagación a gran escala puede realizarse en medio líquido bajo condiciones controladas en sistemas de inmersión temporal (SIT, Georgiev *et al.*, 2014). Los SIT, son sistemas diseñados para el cultivo intensivo de plantas bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas (Afreen, 2008). Su funcionamiento está basado en la alternancia de ciclos de inmersión de los cultivos en medio líquido seguido por un drenado y exposición de los explantes a un ambiente gaseoso (Georgiev *et al.*, 2014); usualmente renovado en cada ciclo por ventilación forzada, aplicada mediante un compresor conectado a un controlador lógico programable (PLC) o temporizador que determina la frecuencias y duración de las inmersiones (Etienne y Berthouly, 2002). Los primeros

acercamientos al uso de estos sistemas fueron los realizados por Harris y Mason (1983), quienes diseñaron un aparato que permitía la inmersión temporal de explantes dentro de matraces Erlenmeyer por medio de movimientos en forma de oscilación y, así, favoreciera los efectos positivos del medio de cultivo líquido y la aireación de los explantes. En 1985, Tisserat y Vandercook desarrollaron una cámara de cultivo de forma alargada que era drenada periódicamente y posteriormente enriquecida con medio fresco. A partir de estos trabajos, diversos sistemas basados en la inmersión temporal han sido desarrollados, diferenciándose en el tamaño y tipo de material del que se fabrican los contenedores, el tipo de soporte de explantes, la existencia de un control computarizado o la utilización de temporizadores y la utilización de un compresor de aire o movimiento mecánico para drenar el medio de cultivo (Etienne y Berthouly, 2002).

El éxito de la micropropagación en SIT depende en gran medida del tiempo y frecuencia de inmersión a la cual sean sometidos los explantes, al volumen del recipiente de cultivo y la cantidad de medio de cultivo por explante inicial y al efecto de cada uno de estos factores sobre los otros (Watt, 2012). Usualmente el tiempo de inmersión de los explantes en el medio de cultivo es de unos pocos minutos, mientras que la exposición de los mismo a un ambiente gaseoso se realiza por un periodo prolongado (Georgiev *et al.*, 2014).

Los SIT han demostrado ser una herramienta eficaz para la micropropagación de diferentes especies vegetales de importancia económica, como banano (Roels *et al.*, 2005; Wilken *et al.*, 2014), café (Ducos *et al.*, 2007; Etienne *et al.*, 2013), piña (González-Olmedo *et al.*, 2005; Scherer *et al.*, 2013), vainilla (Ramos-Castellá *et al.*, 2014; Mosqueda-Ramírez e Iglesias-Andreu, 2016) e incluso caña de azúcar (Lorenzo *et al.*, 1998; Mordocco *et al.*, 2009). Los SIT permiten la automatización en algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard *et al.*, 1993), reduciendo la mano de obra, facilitando el escalamiento a nivel comercial e incrementando la eficiencia biológica y productividad en campo de las especies propagadas (Martre *et al.*, 2001; Ramos-Castellá *et al.*, 2014).

Dentro de los diversos modelos de SIT existentes destaca el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), el cual es uno de los primeros modelos de SIT desarrollados (Lorenzo *et al.*, 1998; Escalona *et al.*, 1999). Fue creado en Cuba por la necesidad de contar un biorreactor de bajo costo basado en el principio de la inmersión temporal. El BIT consiste en dos contenedores (plástico o vidrio) conectados entre sí por mangueras de silicona esterilizables (Georgiev *et al.*, 2014). Uno de los contenedores tiene la función de cámara de crecimiento, mientras que el otro, es el reservorio del medio de cultivo. La cámara de crecimiento puede contener o no un soporte (espuma de poliuretano, metal o plástico) para el material vegetal (Scherer *et al.*, 2013). Cada contenedor está conectado a una línea de aire presurizado que cuenta con una válvula solenoide controlada por un PLC o temporizador (Georgiev *et al.*, 2014). Su diseño simple y versátil hacen del BIT el SIT más favorable para diversos tipos de laboratorios. El BIT ha sido exitosamente utilizado para el cultivo de plántulas, brotes y embriones somáticos (Watt, 2012; Arencibia *et al.*, 2013; Wilken *et al.*, 2014; Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016).

#### **4.6 Micropropagación de Caña de Azúcar en SIT**

La viabilidad de la micropropagación a gran escala de especies de importancia industrial, como caña de azúcar, es actualmente limitada por los altos costos de producción (Mordocco *et al.*, 2009). La semiautomatización de la micropropagación mediante la integración de SIT ofrece nuevas estrategias para abaratar los costos de producción. En este sentido, Lorenzo *et al.* (1998), realizaron los primeros trabajos de micropropagación de caña de azúcar en SIT, comparando la tasa de multiplicación obtenida entre los sistemas de cultivo en medio semisólido, medio líquido estático e inmersión temporal. Como resultado, la utilización de los SIT duplicó la tasa de multiplicación respecto al método convencional y redujo los costos de producción en 46%. De igual manera Mordocco *et al.* (2009) reportaron ahorro de recursos y tiempo en la micropropagación de caña de azúcar en SIT. Snyman *et al.* (2011), reportaron un aumento en la producción de caña de azúcar de nueve veces respecto al sistema en medio semisólido. La calidad de las plántulas de caña

de azúcar obtenidas por micropropagación en SIT también ha sido evaluada (Lorenzo *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003).

#### **4.7 Variación Somaclonal**

La finalidad de la micropropagación es la producción de material vegetal idéntico al donante, de modo que la integridad genética del donante se conserve en la progenie (Lal *et al.*, 2015). A pesar de las ventajas de esta técnica, se ha observado inestabilidad fenotípica y genotípica en especies micropropagadas (Osipova *et al.*, 2011; Bello-Bello *et al.*, 2014; Soliman *et al.*, 2014). Este fenómeno ha sido denominado variación somaclonal y fue descrito por Larkin y Scowcroft (1981) como cualquier tipo de variación genética detectada en plantas derivadas de cultivo *in vitro*, independientemente de la ruta morfogénica o explante utilizado. Más tarde, Kaepler *et al.* (2000), mencionaron que los cambios epigenéticos también deben ser considerados variaciones somaclonales. Aunque la variación somaclonal puede tener aplicaciones útiles en el mejoramiento genético, durante los procesos de micropropagación es indeseable, especialmente en la producción comercial donde se requiere mantener la homogeneidad genética y agronómica de los individuos seleccionados (Sahijram *et al.*, 2003; Lakshmanan *et al.*, 2005; Landey *et al.*, 2013).

La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Larkin y scowcroft, 1981; Kaepler *et al.*, 2000; Sahijram *et al.*, 2003). Entre los tipos de variaciones heredables se han reportado cambios en pares de bases individuales, deleciones cromosómicas, translocaciones y variaciones en los niveles de ploidia (Evans y Sharp, 1986; D'Amato, 1991). Cuando la variación no es heredable puede ser resultado de variaciones epigenéticas reversibles (Kaepler *et al.*, 2000) que pueden estar asociadas a alteraciones en los patrones de metilación del ADN (Kubis *et al.*, 2003).

#### **4.8 Causas de la variación somaclonal**

Las causas de la variación somaclonal no han sido completamente aclaradas (Bairu *et al.*, 2011) pero parece ser el resultado tanto de la variación genética pre-existente

dentro de los explantes como de la variación inducida durante la fase de cultivo de tejidos, incluyendo el genotipo, nivel de ploídía, tipo de explante y vía de regeneración, tipo y concentraciones de reguladores del crecimiento, edad del cultivo *in vitro* y número de subcultivos (Bairu *et al.*, 2011).

*Genotipo y nivel de ploídía.* Existe evidencia de que la variación somaclonal depende del genotipo utilizado, independientemente de método de regeneración (Karp, 1995). En el género *Musa*, algunas variedades suelen mostrar más estabilidad genética que otras (Martinez *et al.*, 1998). Situación similar se reportó en híbridos de *Coffea arabica* (Etienne y Bertrand, 2003).

*Tipo de explante y vía de regeneración.* El tipo de explante afecta la frecuencia y naturaleza de la variación somaclonal (Kawiak y Lojkowska 2004; Chuang *et al.*, 2009). El uso de tejidos meristemáticos, como yemas apicales y axilares, como material inicial reduce la posibilidad de aparición de variación (Skirvin *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2007). Por el contrario, un tejido altamente diferenciado, como raíces u hojas que pasa por una etapa de desdiferenciación con una alta tasa de división celular, puede generar mayor variación somaclonal (Sahijram *et al.*, 2003).

La variación somaclonal suele presentarse en todos los métodos comúnmente empleados para el cultivo *in vitro* de plantas (cultivo de yemas, organogénesis directa o indirecta y embriogénesis somática). Por tanto, al explorar la variación en un nuevo cultivar, es necesario utilizar diferentes tipos de explantes y comparar la variación en su progenie, no se debe asumir que todos los tipos de explantes exhiban la misma variación (Skirvin *et al.*, 1994).

*Tipo y concentración de reguladores de crecimiento.* Se ha encontrado que algunos de estos reguladores, principalmente auxinas, como el 2,4-D y citocininas, como el 6-benzylaminopurina (BAP), pueden generar variación (Sahijram *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2006). En la inducción de callo, la utilización de altas concentraciones de 2,4-D ha causado variación somaclonal en soya (Gesteira *et al.*, 2002), algodón (Jin *et al.*, 2008), chile habanero (Bello-Bello *et al.*, 2014), vainilla (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015), entre otros. Respecto al tipo de auxina, Ahmed *et al.* (2004),

reportaron que en *Caladium*, el mayor número de variantes se presentaba en tratamientos con 2,4-D y no los tratados con ANA e IBA (ácido indol-3-butírico). La utilización de altas concentraciones de BAP (15 mg L<sup>-1</sup>, también ha implicado variación genética en banano cultivar “Williams” (Giménez *et al.*, 2001) y en banano cultivar “Gran enano” (Martin *et al.*, 2006). Por el contrario, el banano cultivar “Nanjanagudu Rasabale” no mostró variaciones somaclonales al ser expuesto altas concentraciones de BAP o KIN (Venkatachalam *et al.*, 2007).

Por lo anterior, utilizar una concentración óptima y una precisa relación de auxinas y citocininas es esencial para una eficiente micropropagación (Letham y Gollnow, 1985).

*Número de subcultivos y edad del cultivo in vitro.* La proporción de variantes somaclonales aumenta en cultivos envejecidos y en explantes con varios subcultivos (Bauri *et al.*, 2011). Lo anterior puede ser atribuido al incremento de la tasa de aparición de mutaciones por ciclo de regeneración y a la acumulación de dichas mutaciones a través del tiempo (Duncan, 1996; Bairu *et al.*, 2006). Coté *et al.*, (2001), desarrollaron un modelo estadístico para predecir las tasas de mutación a través de los ciclos de cultivo. Sin embargo, el modelo ha tenido una aplicación limitada debido a la complejidad de los sistemas biológicos (Bairu *et al.*, 2011). Jambhale *et al.* (2001), reportaron que, en banano, la variación somaclonal aparece a partir del octavo subcultivo, y a medida que aumenta la variación, disminuye la tasa de multiplicación de los propágulos. Resultados similares han sido obtenidos por Soliman *et al.* (2014) y Kılınç *et al.* (2015) en *Stevia rebaudiana* y *Pistacia lentiscus*, respectivamente, donde reportaron un aumento de variación somaclonal en explantes con mayor número de subcultivos. Por esta razón, para mantener la estabilidad genética de las plantas micropropagadas, los laboratorios comerciales deben limitar el número de subcultivos al que será sometido un explante (Skirvin *et al.*, 1994).

#### **4.9 Métodos de detección de la variación somaclonal**

La frecuencia de variación somaclonal puede detectarse con marcadores fenotípicos, bioquímicos y moleculares (Bairu *et al.*, 2011). Mediante marcadores fenotípicos y bioquímicos no es posible detectar diferentes tipos de mutaciones, como son: mutaciones puntuales o elementos genéticos móviles, además estos marcadores están limitados por la influencia del ambiente y por los cambios que ocurren en las diferentes etapas del desarrollo de los individuos (De vicente y Fulton, 2003). Por ello, los métodos de análisis por medio de marcadores moleculares pueden proporcionar más información, ya que las secuencias de ADN son genéticamente idénticas en todas las células de la planta, independientemente del estado fisiológico o de desarrollo de las mismas (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009). Los marcadores moleculares detectan variaciones directas a nivel de ADN y tiene ventajas tales como el hecho de ser dominantes o codominantes, de desarrollarse de manera estable y su amplia cobertura del genoma.

Las técnicas de marcadores moleculares basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction), que usan iniciadores arbitrarios, tienen la característica de no necesitar información de la secuencia del genoma que se está investigando. Esta tecnología utiliza secuencias de iniciadores que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables (no mayores a 6 kb). Para esta tecnología se pueden citar, por ejemplo, los RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y los ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).

#### **4.10 Marcadores ISSR**

Los marcadores ISSR han sido desarrollados a partir de las repeticiones microsatélites (con di, tri, tetra o penta repeticiones de nucleótidos) mediante el anclaje (5' o 3') de iniciadores arbitrarios para dichas repeticiones (Wolfe, 2000). Estos marcadores poseen características que los hacen atractivos para la diferenciación varietal de distintas especies de eucariontes (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Los marcadores ISSR, contrario a los microsatélites (SSR), son dominantes



y no necesitan información previa de la secuencia que amplifican, mostrando ser más reproducibles que los RAPDs (Random Amplified Polymorphic ADN), además son considerados altamente polimórficos (González y Aguirre, 2007). Estas características los hacen idóneos para realizar estudios sobre la variación somaclonal en diferentes especies. Monte-Corvo *et al.* (2001) identificaron variación entre somaclones de pera (*Pyrus communis*) mediante marcadores ISSR. Otros estudios sobre el uso de marcadores ISSR durante el análisis de variación somaclonal han sido reportados en banano (Lakshmanan *et al.*, 2007), chile habanero (Bello-Bello *et al.*, 2014), olivo (Bradaï *et al.*, 2015) e incluso caña de azúcar (Hsie *et al.*, 2015).

#### **4.11 Variación somaclonal en caña de azúcar**

La variación somaclonal en caña de azúcar ha sido ampliamente estudiada desde dos grandes vertientes. La primera, como una importante fuente de variación genética para los programas de mejoramiento genético (Jalaja *et al.*, 2006; Rajeswari *et al.*, 2009) y la segunda como un fenómeno indeseable en los procesos de micropropagación comercial (Jain *et al.*, 2005; Tawar *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2010) donde se requiere mantener las características agronómicas de las variedades seleccionadas (Lal *et al.*, 2015). El primer reporte de variación en plántulas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos se realizó en 1969 por investigadores de la Hawaiian Sugar Planters Association Experiment Station (Heinz y Mee, 1969). En ese trabajo observaron una cantidad considerable de variaciones en número de cromosomas, variaciones morfológicas y variaciones enzimáticas en las plantas regeneradas.

En caña de azúcar, la estabilidad genética suele depender de la variedad. En este sentido Zucchi *et al.* (2002), utilizando marcadores moleculares RAPDs, reportaron mayores niveles de variación en la variedad RB83-5486 que en SP80-185. Por el contrario, en otros cultivares no se ha encontrado variación somaclonal (Jain *et al.*, 2005; Lal *et al.*, 2008; Sahoo *et al.*, 2011).

El nivel de ploidía del material donante es otro factor de variación preexistente estudiado en caña de azúcar, y en general, los explantes de especies con alto nivel de ploidía como caña de azúcar, muestran mayor variabilidad que aquellos con menor ploidía (Karp, 1995). Para probar la existencia de variación somaclonal preexistente, los somaclones pueden ser sometidos a otro ciclo de regeneración *in vitro*, los clones con variación preexistente deben producir mayor variabilidad en la primera generación que en el segundo y, en ciclos posteriores, esta variación se elimina o estabiliza, de aumentar la variación en ciclos posteriores, se deberá a causa de la técnica de cultivo (Skirvin *et al.*, 1994).

El efecto del número de subcultivos en la variación somaclonal de caña de azúcar es un factor que ha sido poco estudiado. En este sentido Zucchi *et al.* (2002), mediante la utilización de marcadores moleculares tipo RAPDs concluyen que la variación somaclonal en la variedad RB83-5486, es independiente del número de subcultivos, atribuyéndola a la variación preexistente en la variedad. Por otra parte, Hsie *et al.* (2015) evaluaron la estabilidad genética de dos cultivares de caña de azúcar mediante marcadores ISSR y reportaron que no existe variación durante la micropropagación en sistema semisólido durante 15 subcultivos.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Material vegetal y establecimiento *in vitro***

Se colectaron ápices de 50 cm de caña de azúcar cultivar Mex 69-290 del Banco de Variedades del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Los ápices fueron transferidos al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del mismo Campus donde se lavaron con agua corriente y se colocaron a 4 °C por tres días. Pasado este tiempo, los ápices se redujeron a una longitud de 20 cm y fueron tratados a termohidroterapia a 50 °C por 20 min. Posteriormente se sumergieron en etanol al 70 % por un minuto y se llevaron a campana de flujo laminar donde se cortaron a 1.5 cm. Finalmente, los explantes fueron sembrados individualmente en tubos de ensaye con 15 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa sin reguladores de crecimiento. El pH de los medios se ajustó a

5.8 con hidróxido de sodio 0.1 N, se adicionó 2.5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA) como agente gelificante y se esterilizó a 120 °C por 15 min en autoclave (FE-299 Felisa®, MEX). Los explantes fueron incubados a 24 ± 2 °C bajo iluminación con lámparas fluorescentes con irradianza de entre 30- 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y fotoperiodo de 16 h luz. Después de una semana de cultivo *in vitro*, se seleccionó un ápice y se transfirió a medio de multiplicación MS suplementado con 3 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de KIN (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA), 0.65 mg L<sup>-1</sup> de AIA (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA) y 0.3 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA). Las condiciones de esterilización del medio de cultivo e incubación fueron similares a las descritas anteriormente. Después de 35 días de cultivo *in vitro*, se contabilizó el número y longitud de brotes por explante.

## **5.2 Micropropagación de caña de azúcar en Biorreactores de Inmersión Temporal**

Los brotes obtenidos en la etapa anterior fueron sembrados nuevamente en medio de multiplicación por 35 días para obtener el material necesario para la micropropagación en BIT. Una vez obtenido el material vegetal, se sembraron ocho explantes (cada uno con dos brotes) por biorreactor y un total de ocho biorreactores. Los BIT utilizados fueron los descritos por Lorenzo *et al.* (1998) con capacidad de 1 L utilizando un volumen de 50 mL de medio de cultivo por explante. El medio de cultivo para la micropropagación en BIT fue el descrito anteriormente para la etapa de multiplicación, pero sin agente gelificante. El tiempo y frecuencia de inmersión fue de 2 min cada 8 h, respectivamente. Las condiciones de esterilización del medio e incubación fueron similares a las descritas anteriormente. Este proceso se repitió cada 35 días por siete ocasiones más, para completar un total de diez subcultivos. En cada subcultivo se contabilizó el número y longitud de brotes por explante.

## **5.3 Diseño Experimental y Análisis estadístico**

El diseño experimental fue completamente al azar con ocho repeticiones (BIT) por subcultivo. Para comparar el número de brotes por explante y la longitud de brotes

entre tratamientos se utilizaron dos diferentes modelos. Un modelo lineal generalizado mixto con distribución Poisson para el número de brotes por explante y un modelo lineal mixto para longitud de brotes. Los datos fueron analizados usando el procedimiento GLIMMIX DE SAS (SAS, versión 9.2). En ambos casos, las medias entre tratamientos se compararon con la prueba LS-Means ( $P < 0.05$ ).

#### **5.4 Análisis de la variación somaclonal**

En cada subcultivo se tomaron muestras de tejido foliar de diez brotes seleccionados al azar y hojas de las plantas madre (donante) se mantuvieron a  $-96^{\circ}\text{C}$  para realizar el análisis de variación somaclonal.

Para la extracción del ADN de cada una de las muestras, se utilizó el protocolo de extracción de Stewart y Via (1993), el cual se basa en el uso del CTAB (Bromuro de cetiltrimetil amonio). La determinación cualitativa de la calidad del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE (Tris, ácido acético, EDTA) 1X a un voltaje de 90 V durante 60 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio ( $1\text{ mg mL}^{-1}$ ). Posteriormente fueron visualizados y documentados en un fotodocumentador (GelDoc-It® Imager. UVP). La cuantificación de ADN fue realizada en un espectrofotómetro UV (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific) a 260 nm.

#### ***Selección de iniciadores ISSR***

Para seleccionar los iniciadores más polimórficos e informativos para el estudio de la variación somaclonal, se evaluaron un total de 29 iniciadores ISSR (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA), empleando una mezcla de ADN de muestras de caña de azúcar. Con base en el número, resolución y repetitividad de las bandas amplificadas se seleccionaron un total de diez iniciadores. Las características de cada uno de los iniciadores evaluados se muestran en el **Cuadro 1**. En negritas se destacan los iniciadores seleccionados

**Cuadro 1.** Características de los iniciadores ISSR evaluados.

No.	Iniciador	Secuencia	°Tm (°C)	Bandas amplificadas	Rango (pb)
1	UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	45	10	300-2000
2	T 06	AGAGAGAGAGAGAGAGGT	50	7	300-1400
3	UBC 835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	45	13	200-2000
4	UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50	-	-
5	UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52	11	300-1550
6	UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50	-	-
7	UBC 822	TCTCTCTCTCTCTCA	50	2	600-1400
8	UBC 809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52	11	300-2000
9	UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52	12	350-2000
10	UBC 823	TCTCTCTCTCTCTCC	52	-	-
11	UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCG	52	-	-
12	UBC 825	ACACACACACACACT	50	-	-
13	UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	50	6	350-1400
14	UBC 848	CACACACACACACARG	52	-	-
15	UBC 864	ATGATGATGATGATGATG	50	5	400-1400
16	UBC 817	CACACACACACACAA	50	-	-
17	UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	50	2	400-750
18	UBC 826	ACACACACACACACACC	52	12	300-2000
19	UBC 828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	50	6	500-1400
20	UBC 827	ACACACACACACACACG	52	6	400-1400
21	C03	TGTCACACACACACACAC	54	5	500-1400
22	C02	GACCACACACACACACAC	57	6	500-1400
23	UBC 857	ACACACACACACACACYG	52	6	400-1400
24	T05	CGTTGTGTGTGTGTGTGT	54	10	400-1400
25	C01	CAGCACACACACACACAC	57	10	400-1400
26	A04	GCAACACACACACACACA	54	13	400-1400
27	C08	ACGAATTGAATTGGACAGAG	56	-	-
28	C09	CAGATGGGAGTCAAGTCAAC	60	-	-
29	C10	ACCTCCTGCAGATTCGTGTC	62	-	-

°Tm: Temperatura de alineamiento, R: residuos de A y G; Y: C y T, pb: pares de bases

### ***Amplificación de ADN con marcadores ISSR***

Se utilizaron diez individuos tomados al azar en cada uno de los diez subcultivos y una planta donante. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µL y contenía los siguientes componentes: Amortiguador Taq 1X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de iniciador, 1 U de Taq. DNA polimerasa y 50 ng de ADN.

El volumen de reacción se completó con agua destilada estéril. En todos los casos se emplearon reactivos de la marca Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador de ADN (MaxyGene, Axygen) bajo las siguientes condiciones térmicas: Un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 50 s a 94 °C, 50 s a diferentes temperaturas de alineamiento (dependiendo de cada iniciador), 90 s a 72 °C y una extensión final a 72° C durante 10 min. Posteriormente se tomaron 8 µL de cada uno de los productos de PCR para su separación por electroforesis en geles de agarosa al 3 % p/v en tampón TAE 1X a 90 V durante 90 min. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 a 10,000 pares de bases (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA). Finalmente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 mg mL<sup>-1</sup>), visualizados y documentados en un fotodocumentador (GelDoc-It® Imager, UVP).

### ***Análisis de datos moleculares***

El perfil de bandas fue analizado mediante una matriz binaria, asignando el número “1” para la presencia y “0” para la ausencia de una banda. Con ello se determinó el porcentaje de polimorfismo en cada subcultivo. Las distancias genéticas entre los subcultivos y la planta donante se estimaron mediante la distancia genética de Nei (Nei, 1972). La matriz de distancias genéticas resultante se utilizó para construir un dendrograma mediante el método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Efecto del número de subcultivo sobre el número y longitud de brotes

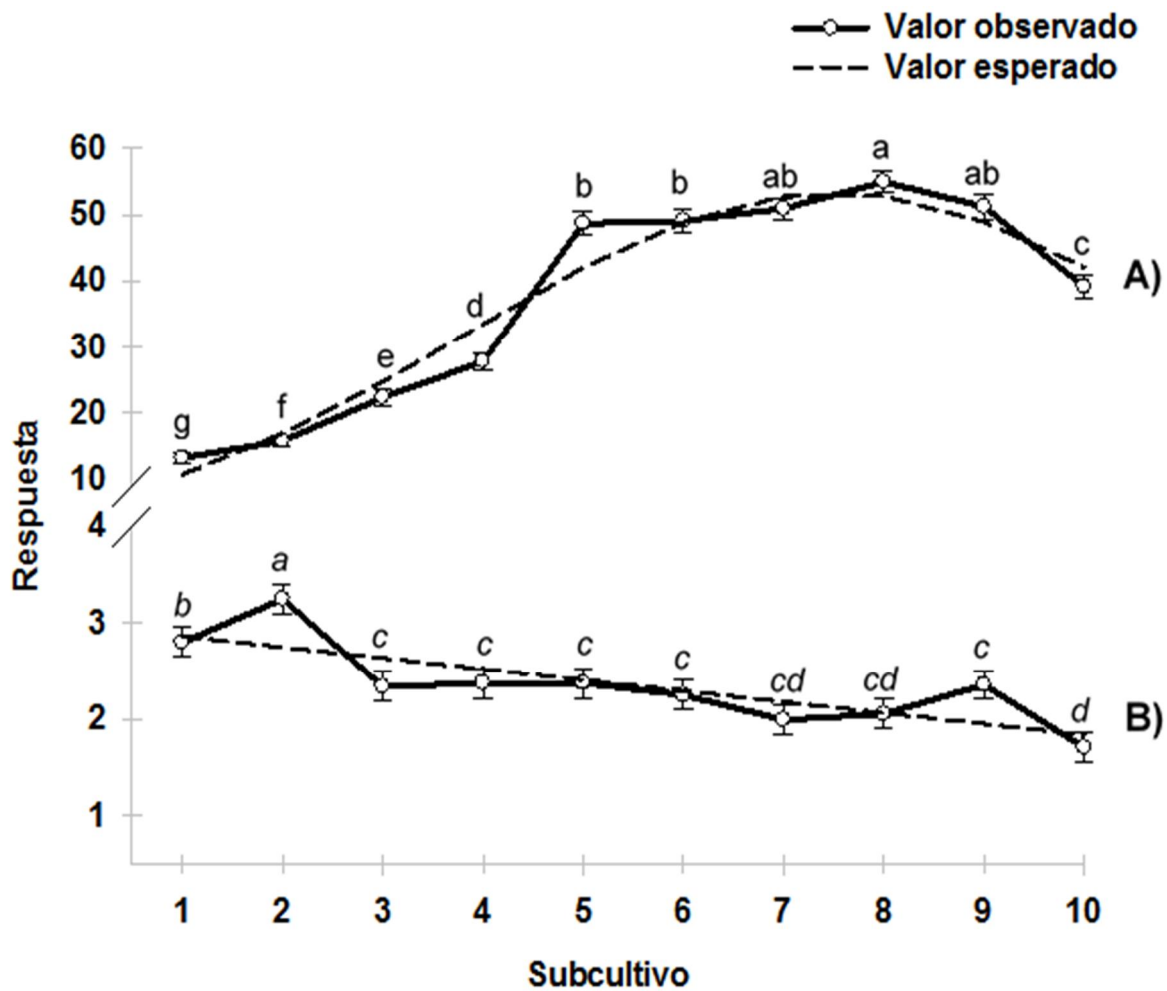
El número y longitud de brotes mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los subcultivos de caña de azúcar cv. Mex 69-290 (**Figuras 1 y 2**). El modelo de regresión para número de brotes fue:  $\hat{Y} = \exp\{1.8496 + (0.5669 * subc) - (0.03777 * subc^2)\}$  y para longitud de brotes:  $\hat{Y} = 2.9768 - (0.1141 * subc)$ . La menor producción de brotes se encontró en los subcultivos uno y dos con 13 y 15 brotes por explante, respectivamente. A medida que aumentó el número de subcultivos, la producción de brotes aumentó hasta el subcultivo número ocho, en el cual se obtuvo la máxima producción de brotes con 55 brotes por explante. A partir del subcultivo número nueve, la producción de brotes disminuyó significativamente a 39 brotes por explante en el subcultivo diez. Respecto a la longitud de brotes, la mayor longitud se obtuvo en los subcultivos uno y dos. De manera general, se observa una tendencia en la disminución de la longitud de brotes a medida que aumenta el número subcultivos. El análisis de regresión confirmó estos resultados, a medida que aumenten los subcultivos, el número y longitud de brotes disminuirá gradualmente (**Figuras 1 y 2**).



**Figura 1.** Efecto del número de subcultivo sobre el número de brotes de caña de azúcar cv. Mex 69-290 utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal. a-j) subcultivo uno a diez, respectivamente. Línea: 1 cm.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la producción de brotes de caña de azúcar tiende a incrementarse hasta el subcultivo ocho y, a partir de este, la producción comienza a decrecer. Mendes *et al.* (1999), analizaron la tasa de multiplicación de banano durante seis subcultivos y reportaron que la tasa de multiplicación tiende a decrecer a partir del subcultivo número cuatro. De forma similar, Vardja y Vardja (2000) reportaron que en gerbera y banano, la mayor producción de brotes se alcanzaba en el subcultivo seis y cinco respectivamente, después de ello, la tasa de multiplicación comienza a decrecer. Respecto a caña de azúcar, Lee (1987) analizó la tasa de multiplicación durante diez subcultivos en medio semisólido, con ápices como explante inicial, y reportó una reducción en la producción de brotes de 19 a 12, entre los subcultivo cinco y diez, respectivamente; mencionando que únicamente se regeneraban plantas normales hasta el séptimo subcultivo. Por otro lado, Chen *et al.* (1988) reportaron que la micropropagación de caña de azúcar, vía embriogénesis somática indirecta, se veía afectada por la edad y número de subcultivos, donde únicamente era posible la producción de embriones en callos con un máximo de edad de 12 meses. En este sentido, los resultados respaldan el hecho de que a mayor número de subcultivo los explantes comienzan a perder su capacidad de regeneración. De acuerdo a Gaspar *et al.* (2000) y Hsie *et al.* (2015), durante la micropropagación, la calidad de los brotes obtenidos disminuye a medida que aumente el número de subcultivos. Caamal-Velazquez y Bello-Bello (2014), recomiendan no más de 10 ciclos de multiplicación, pues sugieren la posibilidad de que la acumulación de variantes somaclonales debido a varios subcultivos afecte negativamente la proliferación de brotes.





**Figura 2.** Efecto del número de subcultivo sobre el número (A) y longitud (cm) de brotes (B) de caña de azúcar cv. Mex 69-290 utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal. Valores seguidos por diferente letra denotan diferencias estadísticas significativas (LS-Means,  $P < 0.05$ ).

Un factor que determina la eficiencia del sistema de micropropagación es la producción de brotes por explante o tasa de multiplicación (Williams y Taji, 1991). Conocer la tasa de multiplicación de los explantes a lo largo de diversos subcultivos es de vital importancia para conservar la calidad de las plántulas obtenidas. Por esta razón, y para mantener la estabilidad genética de las plantas micropropagadas, los laboratorios comerciales deben limitar el número de subcultivos al que será sometido un explante (Skirvin *et al.*, 1994). Sin embargo, aunque la micropropagación de caña de azúcar ha sido ampliamente estudiada (Snyman *et al.*, 2011; Lal *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2015), incluso en sistemas de inmersión temporal (Lorenzo *et al.*, 1998; Mordocco *et al.*, 2009; Snyman *et al.*, 2011), son escasos los trabajos que reporten la tasa de multiplicación en diferentes ciclos de cultivo o subcultivos.

## 6.2 Efecto del número de subcultivo sobre la variación somaclonal de caña de azúcar

El análisis de los resultados reveló la existencia de variación somaclonal a medida que aumentó el número de subcultivos. Los diez marcadores ISSR seleccionados amplificaron un total de 109 bandas (fragmentos). En la **Cuadro 2**, se muestran las bandas amplificadas por iniciador y el número de bandas polimórficas por subcultivo. Los subcultivos con mayor polimorfismo fueron el uno, nueve y diez, con 10.1, 15.6 y 10.1 %, respectivamente. Los subcultivo que menor porcentaje de polimorfismo obtuvieron fueron el dos y cinco con 3.76 %. En la **Figura 3**. Se muestran los perfiles de bandeo ISSR de diferentes subcultivos.

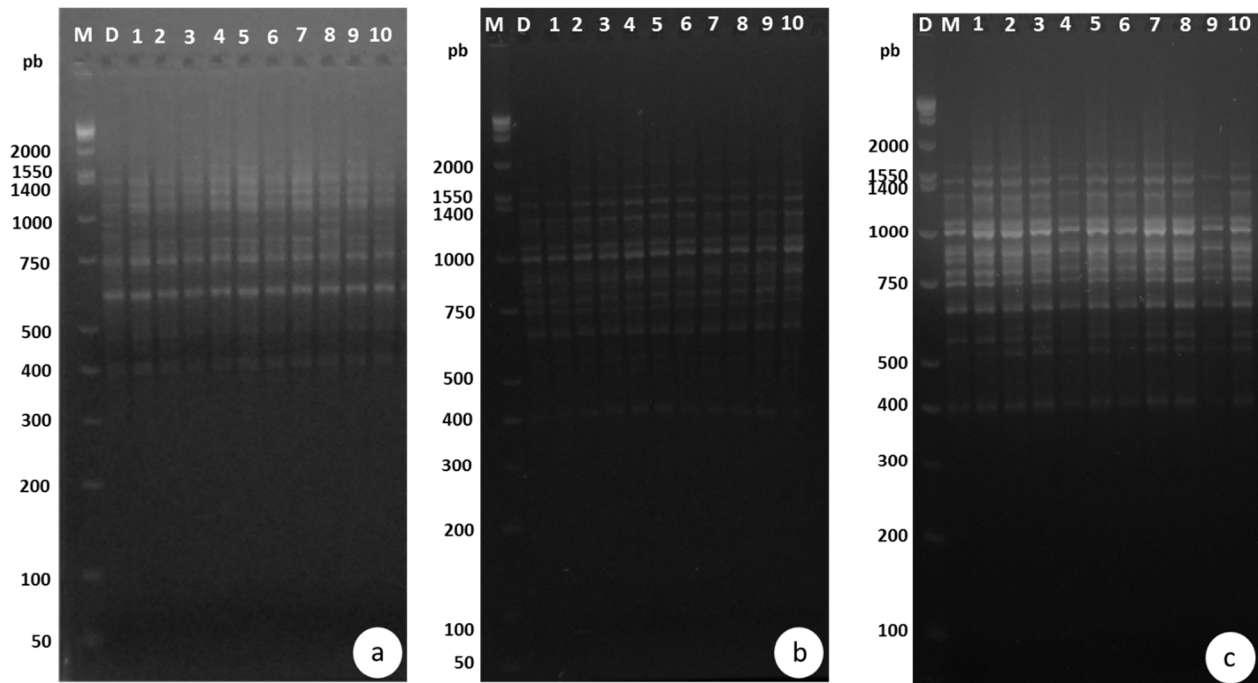
**Cuadro 2.** Efecto del subcultivo sobre el porcentaje de polimorfismo durante la micropropagación de caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal detectado mediante marcadores ISSR.

No.	Iniciador	Secuencia (3'-5')	°Tm	Bandas amplificadas	Bandas polimórficas por subcultivo									
					Uno	Dos	Tres	Cuatro	Cinco	Seis	Siete	Ocho	Nueve	Diez
1	UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	45	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4
2	T06	AGAGAGAGAGAGAGAGGT	50	7	2	2	2	2	2	1	1	1	2	0
3	UBC 835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	45	13	2	0	0	0	1	0	3	0	3	1
4	UBC 826	ACACACACACACACACC	52	12	0	0	0	2	1	0	0	2	1	0
5	UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52	11	2	1	1	0	0	2	0	0	2	2
6	UBC 809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52	11	1	0	1	0	0	0	1	1	2	1
7	UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52	12	0	1	1	1	0	2	1	0	2	0
8	A04	GCAACACACACACACACA	54	13	1	0	2	1	0	0	2	0	2	2
9	C01	CAGCACACACACACACAC	57	10	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
10	T05	CGTTGTGTGTGTGTGTGT	54	10	2	0	0	0	0	0	2	2	1	1
Polimorfismo (%)					10.1	3.67	7.34	6.42	3.67	4.59	9.17	5.5	15.6	10.1

°Tm: Temperatura de alineamiento, R: residuos de A y G; Y: C y T.

El análisis de distancias genéticas de los subcultivos, respecto a la planta donante y su posterior agrupamiento en un dendrograma UPGMA, reveló la formación de tres grupos (**Figura 4**). El primero incluye a la planta donante y los subcultivos dos, tres, cuatros, cinco, seis, siete y ocho; el segundo grupo lo conforma el subcultivo uno y finalmente en el tercer grupo se encontró a los subcultivos nueve y diez.

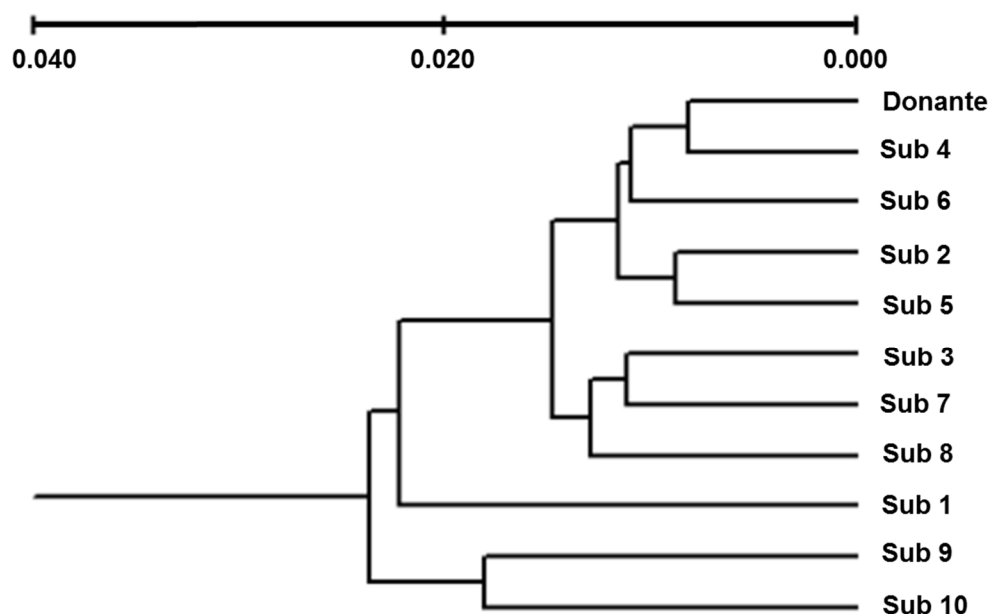
Después del primer subcultivo, la variación entre los subcultivos intermedios (del dos al ocho) es estable, aumentando en los subcultivos finales.



**Figura 3.** Perfiles de bandeos ISSR en gel de agarosa al 3 % de diez plantas del mismo subcultivo, respecto a la planta donante. a) Subcultivo uno, iniciador UBC 809; b) Subcultivo 7, iniciador UBC 826; y c) Subcultivo nueve, iniciador UBC 826. M: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases y D: Planta donante.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Soliman *et al.* (2014), donde la mayor variación somaclonal se encontró en los explantes con mayor número de subcultivos durante la micropropagación de *Stevia rebaudiana*. Kılınc *et al.* (2015) detectaron un aumento en la variación somaclonal a partir del sexto subcultivo de *Pistacia lentiscus*. Demostrando con ello que la variación aumenta conforme aumentan los subcultivos. Resultados similares se reportaron por Bairu *et al.* (2006) en *Musa spp.*, quienes sugieren que someter a un explante a múltiples subcultivos promueve la multiplicación de la variación somaclonal producida en subcultivos anteriores y, por ende, incrementa significativamente en los siguientes subcultivos. Por el contrario, algunas investigaciones reportan baja o nula variación somaclonal durante la micropropagación en medio semisólido de caña de azúcar. Jain *et al.* (2005) evaluaron la estabilidad genética de nueve cultivares de caña de azúcar mediante marcadores moleculares RAPD y reportaron que no existió variación.

Resultados similares fueron obtenidos por Devarumath *et al.* (2007) y Tawar *et al.* (2008), ambos utilizando dos distintos cultivares. Recientemente Hsie *et al.* (2015), también reportaron que no existió variación durante la micropropagación en medio semisólido de dos cultivares de caña de azúcar durante 15 subcultivos. Lo anterior sugiere que la variación depende del genotipo, incluso en la misma especie. Es este sentido, las especies con altos niveles de ploidía (como caña de azúcar) suelen mostrar mayor variación que aquellas especies diploides (Karp, 1995).



**Figura 4.** Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei, calculadas para cada subcultivo respecto a la planta donante.

El objetivo de la micropropagación es producir clones exactamente idénticos al material vegetal de inicio, en un tiempo relativamente corto, de modo que la integridad genética del donante sea conservada en la progenie micropropagada (Lal *et al.*, 2015). Sin embargo, como en el caso de banano (Lakshmanan *et al.*, 2007), chile habanero (Bello-Bello *et al.*, 2014) y olivo (Bradaï *et al.*, 2015), la progenie obtenida en este trabajo presentó variación en los patrones de bandeo de la planta donante y la progenie de diez diferentes subcultivos.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la existencia de variación somaclonal durante la micropropagación de caña de azúcar, y que las plantas producidas durante el primer subcultivo *in vitro* y las plantas con mayor número de subcultivos (nueve y diez subcultivos en este trabajo) tienden a presentar mayor variación somaclonal. Respecto a la alta variación encontrada en el primer subcultivo, Zucchi *et al.* (2002) reportaron resultados similares durante la micropropagación de caña de azúcar en medio semisólido. Reuveni *et al.* (1993) también reportaron variación somaclonal en *Musa* spp. desde el primer ciclo de multiplicación. Recientemente, Soares *et al.* (2016) reportaron que la variación somaclonal aumenta desde el establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas*. Nuestros resultados sugieren que el establecimiento *in vitro* es una etapa sumamente estresante para las células vegetales y difieren de lo usualmente reportado. Jain (2001) sostiene que la técnica de cultivo de tejidos es en sí un factor estresante que puede inducir variaciones genéticas. El estrés es ocasionado desde el aislamiento del tejido para su establecimiento, provocando una reprogramación celular durante la regeneración *in vitro*, que no ocurre en condiciones naturales (*ex vitro*). Lal *et al.* (2015) mencionan que durante el primer ciclo de multiplicación, los brotes obtenidos provienen directamente de tejidos preexistentes altamente organizados como meristemos y yemas axilares y, por tanto, la mayoría de las plantas obtenidas deberían ser idénticas al donante. Por su parte, Zucchi *et al.* (2002), sugieren que la alta variación en el primer subcultivo concuerda con la segregación de genotipos de un meristemo quimérico, dando resultado a una generación inicial altamente polimórfica, debido a la ruptura de la organización meristemática y que, en los subcultivos consecuentes, se espera menor variación. De acuerdo a Kaeppeler (1998), la variación somaclonal puede generar diversos tipos de cambios genéticos entre los que destacan rearrreglos cromosomales, deleciones, inserciones y recombinaciones.

Nuestro estudio reporta por primera vez la variación somaclonal debida a subcultivos en biorreactores de inmersión temporal, utilizando marcadores moleculares ISSR como método de detección. La alta tasa de multiplicación obtenida en este estudio puede ser un factor que promueva la aparición de variación

a medida que aumentan los subcultivos de los explantes. Bairu *et al.* (2006) reportaron una fuerte correlación entre la tasa de multiplicación de *Musa spp.*, en tres concentraciones de BAP a través de diversos subcultivos, y el porcentaje de variación somaclonal, encontrando que la variación somaclonal tiende a ser mayor a medida que aumenta la tasa de multiplicación. Teniendo en cuenta que los reguladores de crecimiento son otro factor que influye en la variación somaclonal, sugieren que el aumento en la variación a través de los subcultivos se deba a la acumulación endógena de BAP durante cada subcultivo.

## VII. CONCLUSIONES

Existe variación somaclonal en la micropropagación de caña de azúcar debido al efecto de los subcultivos, a mayor número de subcultivos, incrementa la probabilidad de variaciones somaclonales.

La mayor variación somaclonal respecto a la planta madre se observó en los subcultivos uno, nueve y diez. Lo anterior sugiere que el establecimiento *in vitro* también es un factor estresante que contribuye a la variación somaclonal.

La mayor producción de brotes durante la micropropagación de caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal se obtuvo en el subcultivo ocho y, a partir de éste la producción de brotes se reduce.

Los marcadores moleculares ISSR resultaron útiles para evaluar la variación somaclonal en caña de azúcar.

De acuerdo a los análisis de regresión, a medida que aumentó los subcultivos, el número y longitud de brotes disminuye gradualmente. Este hecho, probablemente es causado por la acumulación de variación somaclonal.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Afreen, F. (2008). Temporary immersion bioreactor. In: Gupta, S. D., & Ibaraki, Y. (Eds.). *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer, Netherlands, pp. 187-201.
- Ahmed, E. U., Hayashi, T., & Yazawa, S. (2004). Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants. *Scientia horticulturae*, 100(1), 153-159.
- Ali, A., Naz, S., Siddiqui, F. A., & Iqbal, J. (2008). An efficient protocol for large-scale production of sugarcane through micropropagation. *Pakistan Journal of Botany*, 40(1), 139-149.
- Ali, A., Shagufta, N., & Iqbal, J. (2007). Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pakistan Journal of Botany*, 39(6), 1961-1977.
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32(1), 55-60.
- Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., & García-Gonzales, R. (2013). Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Scientia Horticulturae*, 160, 49-53.
- Arencibia, A., Molina, P. R., de la Riva, G., & Selman-Housein, G. (1995). Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant cell reports*, 14(5), 305-309.
- Babu, C. N. (1990). Sugar cane. Allied Publishers. 189 p.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173.
- Bairu, M. W., Fennell, C. W., & van Staden, J. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*, 108(4), 347-351.
- Barba, R., & Nickell, L. G. (1969). Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. *Planta*, 89(3), 299-302.
- Baucum, L. E., Rice, R. W., & Schueneman, T. J. (2006). An overview of Florida sugarcane. *Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida*. Publication# SS-AGR-232.

- Behera, K. K., & Sahoo, S. (2009). Rapid *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. *Nature and science*, 7(4), 1-10.
- Bello-Bello, J. J., Iglesias-Andreu, L. G., Avilés-Viñas, S. A., Gómez-Uc, E., Canto-Flick, A., & Santana-Buzzy, N. (2014). Somaclonal variation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers. *HortScience*, 49(4), 481-485.
- Bower, R., & Birch, R. G. (1992). Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, 2(3), 409-416.
- Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2016). Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on phenotypic stability. *Scientia Horticulturae*, 213, 208-215.
- Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2016). Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on phenotypic stability. *Scientia Horticulturae*, 213, 208-215.
- Caamal-Velázquez, H., & Bello-Bello, J. J. (2014). Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Colegio de Posgraduados, México, 23 p.
- Carneiro, M. S., Rossi, G., Junior, M., & Hoffmann, H. P. (2016). Sugarcane-Basic Information on the Plant. In: Lam, E., Carrer, H., da Silva, J. A., & Kole, C. (Eds.). *Compendium of Bioenergy Plants: Sugarcane*. CRC Press, pp 1 – 13.
- Chen, W. H., Davey, M. R., Power, J. B., & Cocking, E. C. (1988). Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. *Journal of Experimental Botany*, 39(2), 251-261.
- Chuang, S. J., Chen, C. L., Chen, J. J., Chou, W. Y., & Sung, J. M. (2009). Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. *Scientia horticulturae*, 120(1), 121-126.
- CONADESUCA. (2016). Cifras definitivas de cierre de la zafra 2014/2015. <https://www.gob.mx/conadesuca/articulos/cifras-definitivas-de-cierre-de-la-zafra-2014-2015?idiom=es>. Consultado 10 de enero 2017.
- Côte, F. X., Teisson, C., & Perrier, X. (2001). Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: contribution to understanding through a statistical approach. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(5), 539-542.



- Damasco, O. P., Smith, M. K., Adkins, S. W., Hetherington, S. E., & Godwin, I. D. (1997). Identification and characterisation of dwarf off-types from micropropagated Cavendish bananas. In *II International Symposium on Banana: I International Symposium on Banana in the Subtropics 490* (pp. 79-84).
- D'Amato, F. (1991). Nuclear changes in cultured plant cells. *Caryologia*, *44*(3-4), 217-224.
- Daniels, J., & Roach, B. T. (1987). Taxonomy and evolution. In: Heinz, D. J. (Eds.). *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier, Amsterdam, pp 7-84.
- Devarumath, R. M., Doule, R. B., Kwar, P. G., Naikebawane, S. B., & Nerkar, Y. S. (2007). Field performance and RAPD analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants vis-à-vis conventional setts derived plants of sugarcane. *Sugar Tech*, *9*(1), 17-22.
- Ducos, J. P., Labbe, G., Lambot, C., & Pétiard, V. (2007). Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *43*(6), 652-659.
- Duncan, R. R. (1996). Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in agronomy*, *58*, 201-240.
- Enriquez-Poy, M. (2013). Azúcar de caña, la amargura del éxito. *Revista ATAM*, *26*, 40-44.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, *18*(9), 743-748.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *69*(3), 215-231.
- Etienne, H., & Bertrand, B. (2003). Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology*, *23*(6), 419-426.
- Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E., Verdeil, J., & Barry-Etienne, D. (2013). Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree physiology*, *33*(6), 640-653.
- Evans, D. A., & Sharp, W. R. (1986). Applications of somaclonal variation. *Nature Biotechnology*, *4*(6), 528-532.

- Faostat, F. A. O. (2016). Statistical databases. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Consultado 10 de enero 2017.
- Flores, C. S. (2007). Las plagas de la caña de azúcar en México. ATAM, México, 308 p.
- Franklin, G., Arvinth, S., Sheeba, C. J., Kanchana, M., & Subramonian, N. (2006). Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants. *Plant Growth Regulation*, 50(2-3), 111-119.
- García, R., Cidade, D., Castellar, A., Lips, A., Magioli, C., Callado, C., & Mansur, E. (2007). *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. *Plant cell, tissue and organ culture*, 90(2), 181-190.
- Gaspar, T., Kevers, C., Bisbis, B., Franck, T., Crevecoeur, M., Greppin, H., & Dommès, J. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance loss of plant organogenic totipotency in the course of *In vitro* neoplastic progression. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(3), 171-181.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607-621.
- Gesteira, A. S., Otoni, W. C., Barros, E. G., & Moreira, M. A. (2002). RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. *Plant Breeding*, 121(3), 269-271.
- Gill, R., Malhotra, P. K., & Gosal, S. S. (2006). Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. *Plant cell, tissue and organ culture*, 84(2), 227-231.
- Giménez, C., De García, E., De Enrech, N. X., & Blanca, I. (2001). Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2), 217-222.
- Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., & Sentíes-Herrera, H. E. (2014). Sugarcane as a novel biofactory: potentialities and challenges. In: Guevara-González, R., & Torres-Pacheco, I. (Eds.). *Biosystems engineering: Biofactories for food production in Century XXI*. Springer, Switzerland, pp. 129-149.
- González, A., & Aguirre, X. (2007). Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). En: Eguiarte, L. E., Souza, V., & Aguirre, X. (Comp.). *Ecología molecular*. Instituto

- Nacional de Ecología (Semarnat) y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio), Ciudad de México, pp. 567-571.
- González-Olmedo, J. L., Fundora, Z., Molina, L. A., Abdulnour, J., Desjardins, Y., & Escalona, M. (2005). New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactors. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(1), 87-90.
- Harris, R. E., & Mason, E. B. (1983). Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Canadian Journal of Plant Science*, 63(1), 311-316.
- Heinz, D. J., & Mee, G. W. (1969). Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop science*, 9(3), 346-348.
- Heinz, D. J., & Mee, G. W. (1971). Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *American journal of botany*, 257-262.
- Hoarau, J. Y., Grivet, L., Offmann, B., Raboin, L. M., Diorflar, J. P., Payet, J., Hellmann M., D'Hont A. & Glaszmann, J. C. (2002). Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). II. Detection of QTLs for yield components. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6-7), 1027-1037.
- Hsie, B. S., Brito, J. Z., Vila Nova, M. X., Borges-Paluch, L. R., Silva, M. V., & Donato, V. M. S. T. (2015). Determining the genetic stability of micropropagated sugarcane using inter-simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 17651-17659.
- Jain, R., Srivastava, S., Singh, J., & Gupta, P. S. (2005). Assessment of genetic purity of micropropagated plants of sugarcane by isozyme and RAPD analysis. *Sugar Tech*, 7(2-3), 15-19.
- Jain, S. M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118(2), 153-166.
- Jalaja, N. C., Sreenivasan, T. V., Pawar, S. M., Bhoi, P. G., & Garker, R. M. (2006). Co 94012—a new sugarcane variety through somaclonal variation. *Sugar Tech*, 8(2-3), 132-136.
- Jambhale, N. D., Patil, S. C., Jadhav, A. S., Pawar, S. V., & Waghmode, B. D. (2001). Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones. *Infomusa*, 10(1), 38-39.
- Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y., & Zhang, X. (2008). Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports*, 27(8), 1303-1316.

- Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F., & Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant molecular biology*, 43(2-3), 179-188.
- Kaeppler, S. M., Phillips, R. L., & Olhoft, P. (1998). Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. In: Jain, S. M., Brar, D. S., & Ahloowalia, B. S. (Eds.). *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Springer, Netherlands, pp. 465-484.
- Karp, A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, 85(1-3), 295-302.
- Kaur, A., & Sandhu, J. S. (2015). High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agri-business industry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(1), 339-350.
- Kawiak, A., & Łojkowska, E. (2004). Application of RAPD in the determination of genetic fidelity in micropropagated *Drosera* plantlets. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(6), 592-595.
- Kılınç, F. M., Süzerer, V., Çiftçi, Y. Ö., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu, A. A., Tilkat, e., Koc, I., Akdemir, O. F., & Metin, Ö. K. (2015). Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers. *Plant Growth Regulation*, 75(1), 75-88.
- Kubis, S. E., Castilho, A. M., Vershinin, A. V., & Heslop-Harrison, J. S. P. (2003). Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant molecular biology*, 52(1), 69-79.
- Lakshmanan, P., Geijskes, R. J., Aitken, K. S., Grof, C. L., Bonnett, G. D., & Smith, G. R. (2005). Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(4), 345-363.
- Lakshmanan, P., Geijskes, R. J., Wang, L., Elliott, A., Grof, C. P., Berding, N., & Smith, G. R. (2006). Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant cell reports*, 25(10), 1007-1015.
- Lakshmanan, V., Reddampalli Venkataramareddy, S., & Neelwarne, B. (2007). Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(1), 106-113.
- Lal, M., Singh, R. K., Srivastava, S., Singh, N., Singh, S. P., & Sharma, M. L. (2008). RAPD marker based analysis of micropropagated plantlets of sugarcane for early evaluation of genetic fidelity. *Sugar tech*, 10(1), 99-103.

- Lal, M., Tiwari, A. K., & Gupta, G. N. (2015). Commercial Scale Micropropagation of Sugarcane: Constraints and Remedies. *Sugar Tech*, 17(4), 339-347.
- Landey, R. B., Cenci, A., Georget, F., Bertrand, B., Camayo, G., Dechamp, E., Herrera, J. C., Santoni, S., Lashermes, P., Simpson, J., & Etienne, H. (2013). High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PLOS one*, 8(2), e56372.
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied Genetics*, 60(4), 197-214.
- Lee, T. S. G. (1987). Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 10(1), 47-55.
- Letham, D. S., & Gollnow, B. I. (1985). Regulators of cell division in plant tissues. XXX. Cytokinin metabolism in relation to radish cotyledon expansion and senescence. *Journal of plant growth regulation*, 4(1-4), 129-145.
- Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., & Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54(3), 197-200.
- Lorenzo, J. C., Ojeda, E., Espinosa, A., & Borroto, C. (2001). Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 803-806.
- Martin, K. P., Pachathundikandi, S. K., Zhang, C. L., Slater, A., & Madassery, J. (2006). RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(2), 188-192.
- Martinez, O., Reyes, L. M., & Beltran, M. (1998). Chemovariability in the genus *Musa*: similarities and differences. *Infomusa*, 7(2), 16-20.
- Martre, P., Lacan, D., Just, D., & Teisson, C. (2001). Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 25-35.
- Mendes, B. M. J., Filippi, S. B., Demetrio, C. G. B., & Rodriguez, A. P. M. (1999). A statistical approach to study the dynamics of micropropagation rates, using banana (*Musa* spp.) as an example. *Plant cell reports*, 18(12), 967-971.

- Monte-Corvo, L., Goulão, L., & Oliveira, C. (2001). ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(5), 517-522.
- Moore, P. H., Paterson, A. H., & Tew, T. (2014). Sugarcane: the crop, the plant, and domestication. In: Moore, P. H., & Botha FC (Eds.). *Sugarcane: physiology, biochemistry and functional biology*. Wiley Blackwell, Oxford, pp 1–17.
- Mordocco, A. M., Brumbley, J. A., & Lakshmanan, P. (2009). Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(4), 450-457.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Nickell, L. G. (1964). Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. *Hawaii Plant Rec*, 57, 223-229.
- Osipova, E. S., Lysenko, E. A., Troitsky, A. V., Dolgikh, Y. I., Shamina, Z. B., & Gostimskii, S. A. (2011). Analysis of SCAR marker nucleotide sequences in maize (*Zea mays* L.) somaclones. *Plant science*, 180(2), 313-322.
- Pandey, R. N., Rastogi, J., Sharma, M. L., & Singh, R. K. (2011). Technologies for cost reduction in sugarcane micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 10(40), 7805.
- Parmessur, Y., Aljanabi, S., Saumtally, S., & Dookun-Saumtally, A. (2002). Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *Plant Pathology*, 51(5), 561-566.
- Pathak, S., Lal, M., Tiwan, A. K., & Sharma, M. L. (2009). Effect of growth regulators on *in vitro* multiplication and rooting of shoot cultures in sugarcane. *Sugar Tech*, 11(1), 86-88.
- Perera, M. F., García, M. G., Noguera, A. S., Sepúlveda Tusek, M., Filippone, M. P., & Castagnaro, A. P. (2010). Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante marcadores moleculares. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 87(2), 13-21.
- Pérez-Molphe, E. M., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179 p.

- Rajeswari, S., Thirugnanakumar, S., Anandan, A., & Krishnamurthi, M. (2009). Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits. *Euphytica*, 168(1), 71.
- Ramgareeb, S., Snyman, S. J., Van Antwerpen, T., & Rutherford, R. S. (2010). Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(2), 175-181.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(3), 657-664.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(2), 154-160.
- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., & Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(5), 576-581.
- Reuveni, O., Golubowicz, S., & Israeli, Y. (1992, June). Factors influencing the occurrence of somaclonal variations in micropropagated bananas. In: *II International Symposium on In vitro Culture and Horticultural Breeding 336*, pp. 357-364.
- Rodríguez, R., Cid, M., Pina, D., González-Olmedo, J. L., & Desjardins, Y. (2003). Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39(6), 657-662.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Sandoval, J., & Debergh, P. (2005). Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 57-66.
- Sahijram, L., Soneji, J. R., & Bollamma, K. T. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(6), 551-556.
- Sahoo, D. P., Samantrai, D., & Rout, G. R. (2011). Rapid clonal propagation of *Saccharum officinarum* L. Vars. CO-6907 and CO-86249 and to assess the genetic uniformity through molecular markers. *Plant Biosystems-An*

*International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 145(2), 445-451.

Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V. (2009). Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 135-151.

Sandhu, S. K., Gosal, S. S., Thind, K. S., Uppal, S. K., Sharma, B., Meeta, M., Singh, K., & Cheema, G. S. (2009). Field performance of micropropagated plants and potential of seed cane for stalk yield and quality in sugarcane. *Sugar tech*, 11(1), 34-38.

Sawant, R. A., Tawar, P. N., Meti, N. T., & Ranjekar, P. K. (2014). Role of Sugarcane Micropropagation for Production of Quality Seed. *International Journal of Recent Biotechnology*, 2(4), 34-41.

Scherer, R. F., Garcia, A. C., de Freitas Fraga, H. P., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D. A., & Guerra, M. P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151, 38-45.

Sentíes-Herrera, H. E., Gómez-Merino, F. C., Valdez-Balero, A., Silva-Rojas, H. V., & Trejo-Téllez, L. I. (2014). The agro-industrial sugarcane system in Mexico: Current status, challenges and opportunities. *Journal of Agricultural Science*, 6(4), 26-54.

Sharma, S. K., Bryan, G. J., Winfield, M. O., & Millam, S. (2007). Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta*, 226(6), 1449-1458.

Sharma, S., Shahzad, A., Akhtar, R., & Upadhyay, A. (2016). Micropropagation: A Boon for Conservation of Valuable Vines and Lianas. In: Shahzad, A., Sharma, S., & Siddiqui, S. A (eds.). *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Springer International Publishing, pp. 163-193.

SIAP. (2016). Cierre de la producción agrícola por cultivo. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/identidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp). Consultado 10 de enero 2017.

Singh, G., & Shetty, S. (2011). Impact of tissue culture on agriculture in India. *Biotechnol Bioinforma Bioeng*, 1, 147-158.



- Singh, N., Kumar, A., & Garg, G. K. (2006). Genotype dependent influence of phytohormone combination and subculturing on micropropagation of sugarcane varieties. *Indian Journal of biotechnology*, 5(1), 99-106.
- Skirvin, R. M., McPheeters, K. D., & Norton, M. (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, 29(11), 1232-1237.
- Snyman, S. J., Meyer, G. M., Koch, A. C., Banasiak, M., & Watt, M. P. (2011). Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(2), 234-249.
- Soares, D. M. M., Sattler, M. C., da Silva Ferreira, M. F., & Praça-Fontes, M. M. (2016). Assessment of Genetic Stability in Three Generations of *In vitro* Propagated *Jatropha curcas* L. Plantlets Using ISSR Markers. *Tropical Plant Biology*, 1-10.
- Soliman, H. I. A., Metwali, E. M. R., & Almaghrabi, O. A. H. (2014). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Betroni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Plant Biotechnology*, 31(3), 249-256.
- Stewart Jr, C. N., & Via, L. E. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14(5), 748-750.
- Tawar, P. N., Sawant, R. A., Dalvi, S. G., Nikam, A. A., Kavar, P. G., & Devarumath, R. M. (2008). An assessment of somaclonal variation in micropropagated plants of sugarcane by RAPD markers. *Sugar Tech*, 10(2), 124-127.
- Taylor, P. W., & Dukic, S. (1993). Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. *Plant cell, tissue and organ culture*, 34(2), 217-222.
- Thorpe, T. A. (2006). History of plant tissue culture. *Plant cell culture protocols*, 318, 9-32.
- Tisserat, B., & Vandercook, C. E. (1985). Development of an automated plant culture system. *Plant cell, tissue and organ culture*, 5(2), 107-117.
- Tiwari, A., Bharti, Y., Tripathi, S., Mishra, N., Lal, M., Rao, G., Sharma, P., & Sharma, M. (2010). Biotechnological approaches to improve sugarcane crop with special reference to disease resistance. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 45(2), 235-249.

- Vardja, R., & Vardja, T. (2001). The effect of cytokinin type and concentration and the number of subcultures on the multiplication rate of some decorative plants. *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol*, 50(1), 22-32.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R. V., & Bhagyalakshmi, N. (2007). Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(3), 267-274.
- Vicente, M. C., Fulton, T., & Giraldo, N. (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. *Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia*, 1, 1-52.
- Wagih, M. E., Gordon, G. H., Ryan, C. C., & Adkins, S. W. (1995). Development of an axillary bud culture technique for Fiji disease virus elimination in sugarcane. *Australian Journal of Botany*, 43(1), 135-143.
- Watt, M. P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14025-14035.
- Wilken, D., Gonzalez, E. J., Gerth, A., Gómez-Kosky, R., Schumann, A., & Claus, D. (2014). Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv.'Grande naine'AAA). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(5), 582-589.
- Williams, R. R., & Taji, A. M. (1991). Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (JM Black) *in vitro* shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 26(1), 1-6.
- Winkelmann, T., Geier, T., & Preil, W. (2006). Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985–2004. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(3), 319-327.
- Wolfe, A. (2000). ISSR Resource Website. <http://www.biosci.ohiostate.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>. Consultado 15 agosto 2016
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.
- Zucchi, M. I., Arizono, H., Morais, V. A., Fungaro, M. H. P., & Vieira, M. L. C. (2002). Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genetics and Molecular Biology*, 25(1), 91-96.