

TECNICAS PARA LA MICROPROPAGACION DE LA CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum* L.) MEDIANTE EL CULTIVO DE TEJIDOS Y YEMAS

Por: Fernando Payán A.*

Horacio Carmen **

Gilberto Tascón**

INTRODUCCION

Nichel (11) empezó los estudios de cultivo de células y tejidos con la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Hawaii obteniendo éxito en la diferenciación de plantas. Heinz y Mee (4), en 1969 realizaron también con éxito estudios tendientes a obtener mayor información sobre las técnicas para inducir la formación de callos y la diferenciación a diferentes tejidos de caña de azúcar.

Debido a problemas que se han presentado con relación a la formación de raíces, A. M. Nadar y D. J. Heinz (10), exploraron diferentes procedimientos para mejorar la formación de raíces en las plántulas diferenciadas, encontrando que los requerimientos hormonales para la diferenciación del brote aéreo difieren de los requerimientos para la inducción de raíces.

Además de las investigaciones que están realizando en Hawaii, actualmente se realizan estudios en Taiwan, Fiji, Louisiana, Florida, Maryland y Argentina (12, 2). En Colombia no se ha realizado hasta la fecha, ninguna investigación en el campo de cultivo de tejidos, a pesar de ser un país donde se cultiva intensamente la caña de azúcar.

Estas técnicas de cultivo de tejidos y de células en caña de azúcar, además de su importancia en el campo de las ciencias básicas tiene gran aplicación práctica en propagación vegetativa, estudios de fitopatología (6, 7), (obtención de plantas libres de patógenos) y en el mejoramiento genético del cultivo; por ejemplo en éste último campo se puede lograr cambios a nivel celular mediante la inducción artificial de mutaciones, manipulación del número de cromosomas ya sea a nivel haploide o poliploide, obtención de plantas puras en pocos años mediante el cultivo de anteras (androgenesis) y transformaciones (1, 8, 5, 3).

* Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia - Palmira

** Estudiantes de pre-grado Universidad Nacional de Colombia - Palmira.

Los objetivos principales del presente trabajo de investigación fueron:

1. Encontrar la forma más adecuada y eficiente para el cultivo de tejidos en nuestro medio.
2. Determinar qué tipo de tejido es el más conveniente para la micropropagación.
3. Inducir la rizogénesis a las plántulas (plantlets) obtenidas.
4. Explorar la posibilidad de propagar la caña de azúcar mediante el cultivo de yemas axilares.

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Genética y Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de Palmira.

Se seleccionaron las variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) más importantes en nuestro país: P. O. J. 28- 78 y C. P. 57-603.

El material para el cultivo de tejidos se obtuvo de plantas de seis (6) a ocho (8) meses de edad.

Se utilizó tejido foliar (tomado de hojas no desarrolladas del apicifolio), tejido parenquimatoso (del sexto o cuarto entrenudo hasta el apicifolio) y yemas axilares (novenio al quinto nudo).

Se prepararon tres medios nutritivos (MS₀, MS₁ y MS₂), empleando las sales minerales recomendadas en la solución de Murashige-Skoog (9), para los tres medios con las siguientes modificaciones en los demás constituyentes:

MS₀: Leche de coco (18o/o por volumen), tiamina (1 mgr/1) myo-inositol (100 mgr/1), sucrosa (20 gr/1) y agar (7 gr/1).

MS₁: MS₀ + 2,4-D (2 y 3 mgr/1).

MS₂: MS₀ + ANA (5 y 6 mgr/ 1) - leche de coco.

Las técnicas de micropropagación fueron divididas en cuatro fases:

Fase I. Formación del callo.

Una vez efectuada la disección y esterilización del tejido fueron cultivadas en el medio nutritivo MS₁. Los tubos de ensayo con el tejido se colocaron de 15 a 25 días, bajo luz continua suministrada por una lámpara de Neón de 40 W a una distancia de 30 cms. y temperatura promedio de 31°C.

Fase II. Diferenciación

Los callos obtenidos del tratamiento anterior se transfirieron a un nuevo tubo de ensayo con la solución nutritiva MS₁, al cual no se le agregó 2,4 D para inducir la diferenciación de las células. Se colocaron de 15-30 días bajo las mismas condiciones ambientales de la fase I.

Fase III. Inducción de raíces.

Puesto que en los primeros ensayos se encontró que el desarrollo radicular era muy escaso en las plántulas obtenidas, se decidió hacer el siguiente tratamiento para favorecer un desarrollo más precoz de las raíces.

Se pasaron callos en proceso de diferenciación y plántulas sin raíces a tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo MS₂. Se cultivaron de 50-60 días bajo las mismas condiciones ambientales de las fases anteriores.

Fase IV. Transplante a suelo.

Una vez que las plántulas tuvieron un desarrollo vigoroso se procedió a transplantarlas a materas con suelo.

Se extrajeron las plántulas de los tubos de ensayo y se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el agar y la solución nutritiva. Se sembraron en materas con 50o/o de suelo del cultivo y 50o/o de arena y se cubrieron con beakers o bolsas plásticas de polietileno durante catorce (14) días. Para evitar los efectos adversos de este cambio brusco se sometieron al siguiente proceso de "endurecimiento"; al tercero o cuarto día se destaparon durante 15 minutos, al día siguiente por 30 minutos y luego por espacio de 1 hora hasta que al décimo cuarto día se destaparon completamente.

Ensayos.

Debido a las condiciones particulares del trabajo y para lograr los ob-

jetivos, se le dió a la investigación un carácter secuencial, en donde cada nuevo ensayo se apoya en las experiencias logradas en el anterior.

Ensayo No. 1

Se emplearon 12 tratamientos provenientes del siguiente factorial : 2(variedades) x 2 (tipos de tejido) x 3(concentraciones). Las dos variedades fueron P.O.J. 28-78 y C.P. 57-603, los tejidos fueron foliar y parenquima y las concentraciones de 0,2 y 3 mgr/1 de 2,4-D. Los cuatro testigos (concentración 0) con 10 tubos y los demás con 25 tubos de ensayo en la Fase I. Ver diagrama No. 1.

Ensayo No. 2.

Se emplearon en este ensayo 4 tratamientos provenientes del siguiente factorial: 2(variedades) x 1 (tipo de tejido)x 2(concentraciones). Las variedades fueron P.O.J. 28-78 y C.P. 57-603, el tejido fué foliar y las concentraciones 5 y 6 mgr/1 de naftalenacético (ANA).

Además se halló el incremento de peso. Cada tratamiento con 60 tubos de ensayo en la Fase I. El Diagrama No. 2 esquematiza el ensayo.

Ensayo No. 3

Se utilizaron 8 tratamientos según el siguiente factorial: 2(variedades) x 1(tipo de tejido)x 4(combinaciones). Las variedades empleadas fueron las mismas, el tejido fué yemas axilares y dependiendo del propósito se procedió a la combinación de las Fases I, II, III y IV, con las mismas características de los ensayos 1 y 2 en lo referente a constitución y objetivo del medio. Los diagramas 3, 4, 5 y 6 ilustran las cuatro combinaciones de este ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayo No. 1

El objetivo de este primer ensayo era determinar el tipo de tejido y la concentración de 2,4-D más adecuada para la micropropagación de la caña de azúcar. Los resultados se ilustran en el Cuadro No. 1.

Fase I - Formación de Callo.

Con respecto a la formación de callo ambos tejidos dieron muy buenos resultados. El tejido paranquimatoso 100o/o y el tejido foliar 94.5o/o.

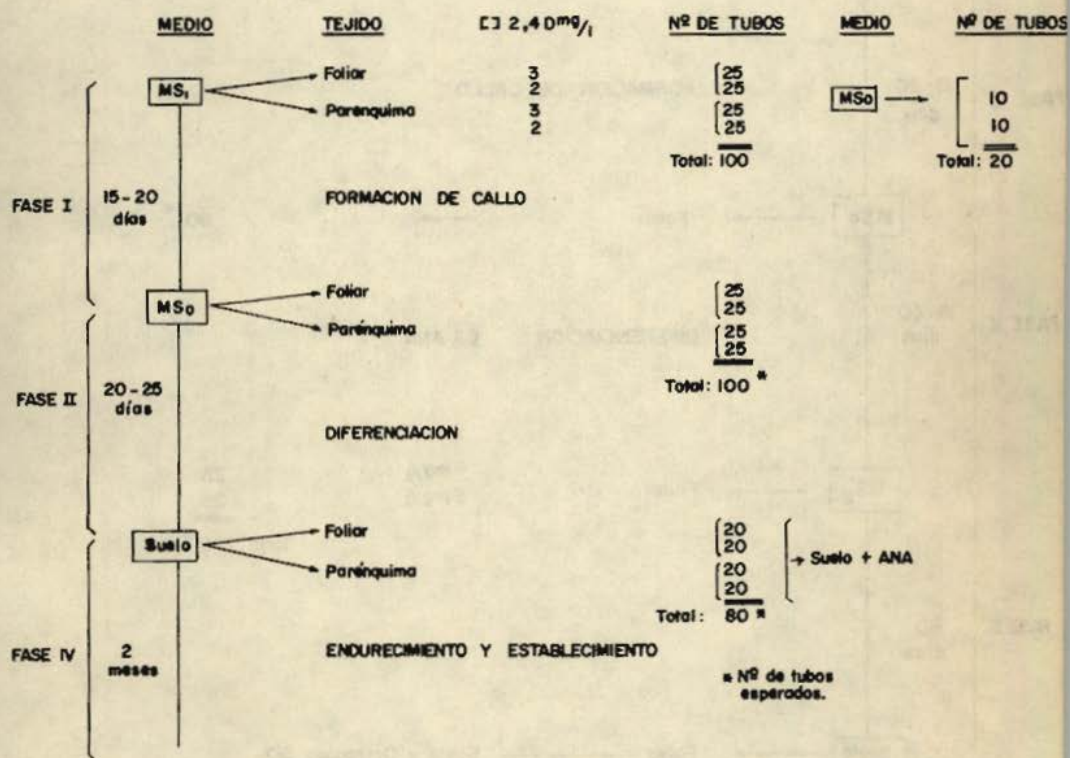


DIAGRAMA Nº 1- REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ENSAYO Nº 1

Variedades: C.P.57-603 (V₁)

P.O. J.28-78 (V₂)

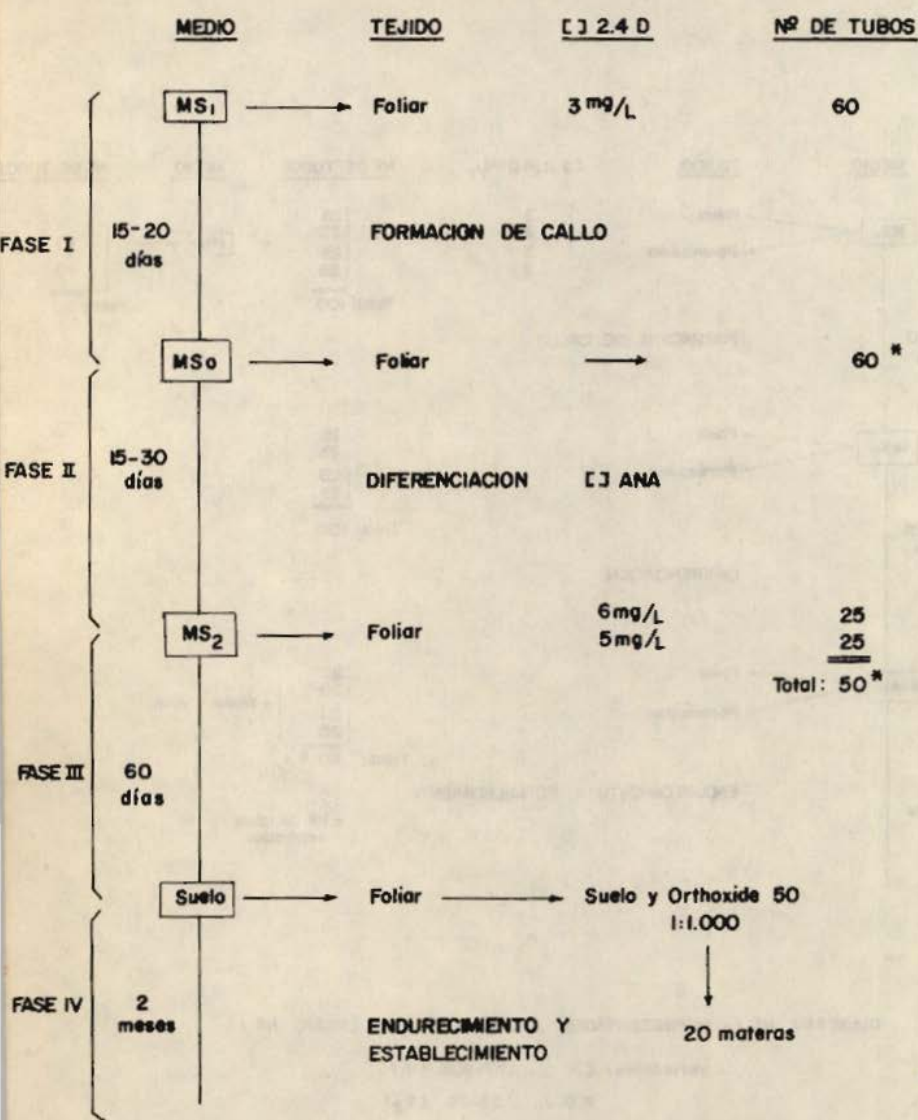


DIAGRAMA Nº 2 - REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ENSAYO Nº 2

Variedades: C.R. 57 - 603 (V₁)

R.O.J. 26-78 (V₂)

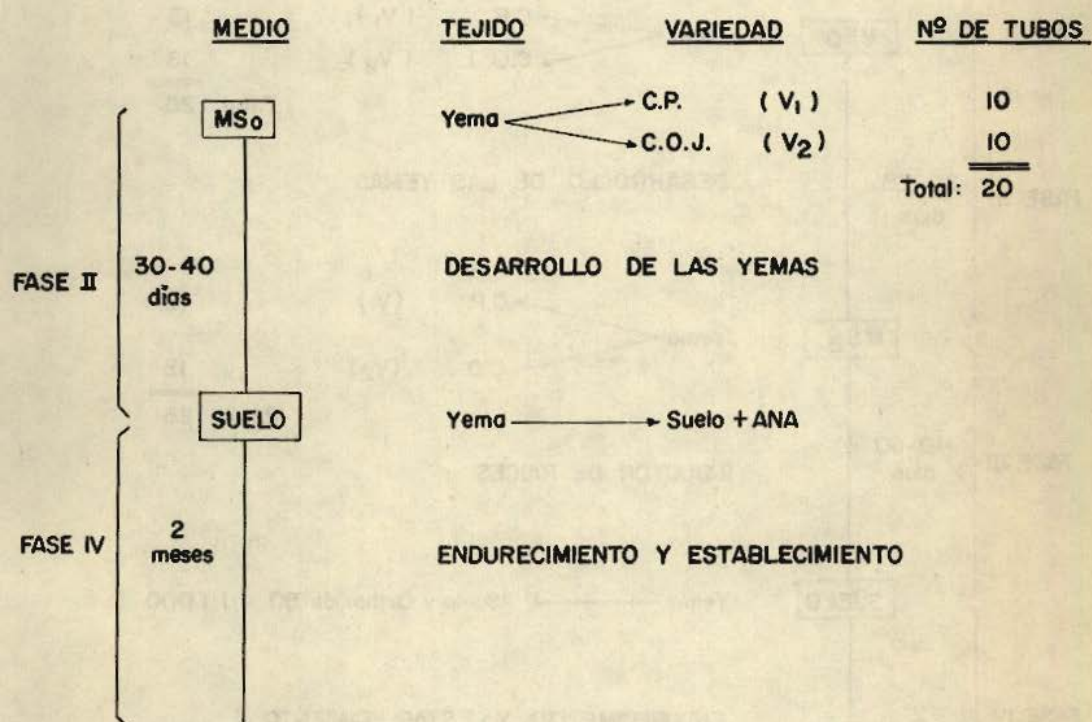


DIAGRAMA Nº 3 - REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ENSAYO Nº 3 a.

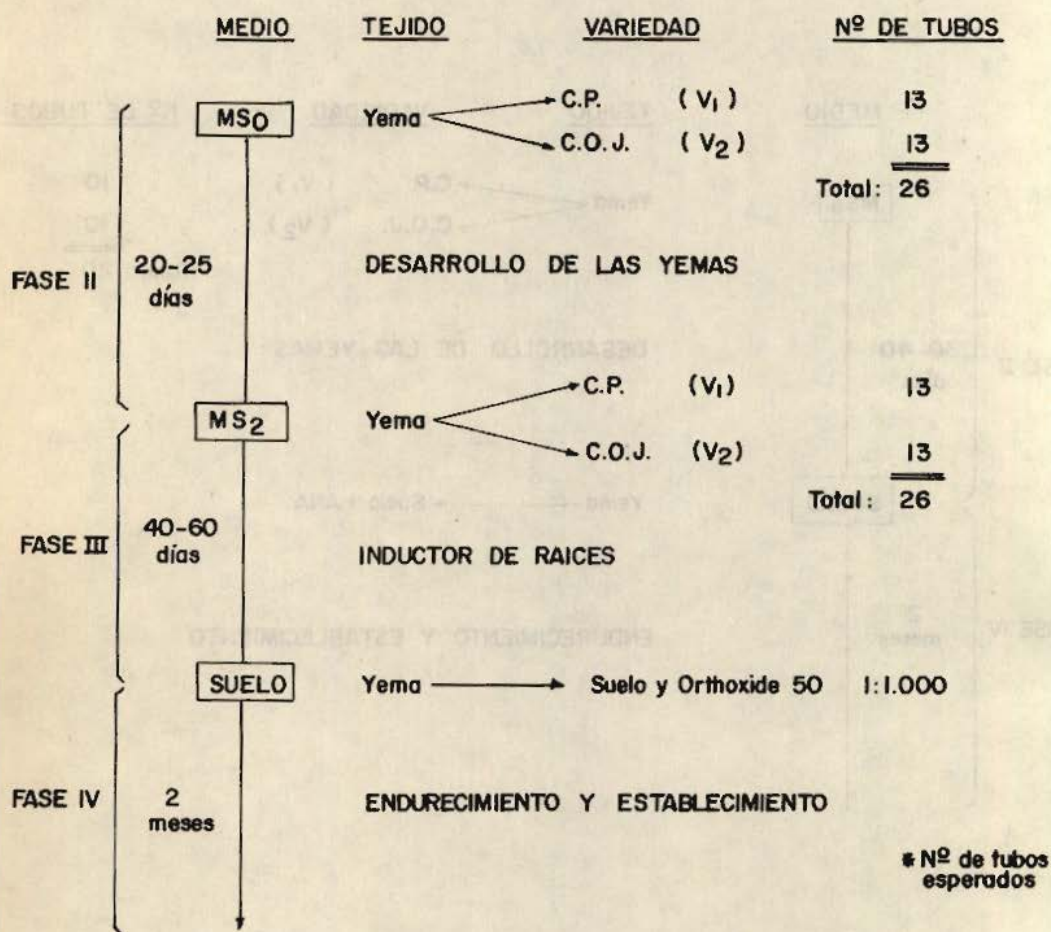


DIAGRAMA Nº :- REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ENSAYO 3 b.

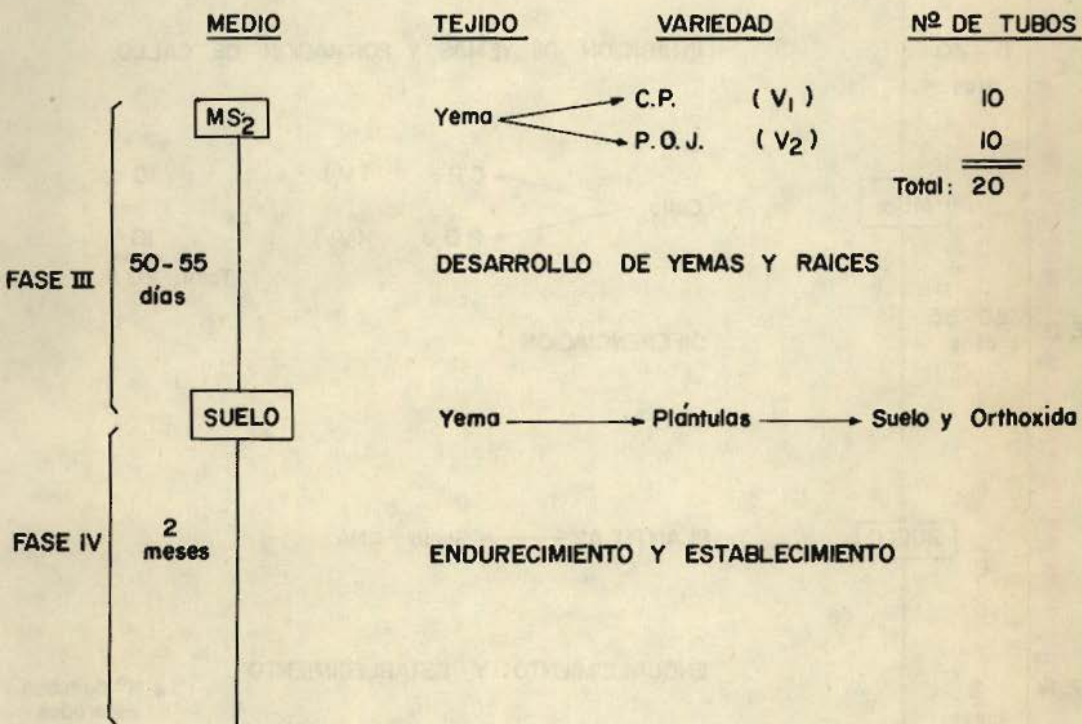


DIAGRAMA Nº 5 - REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ENSAYO Nº 3 c

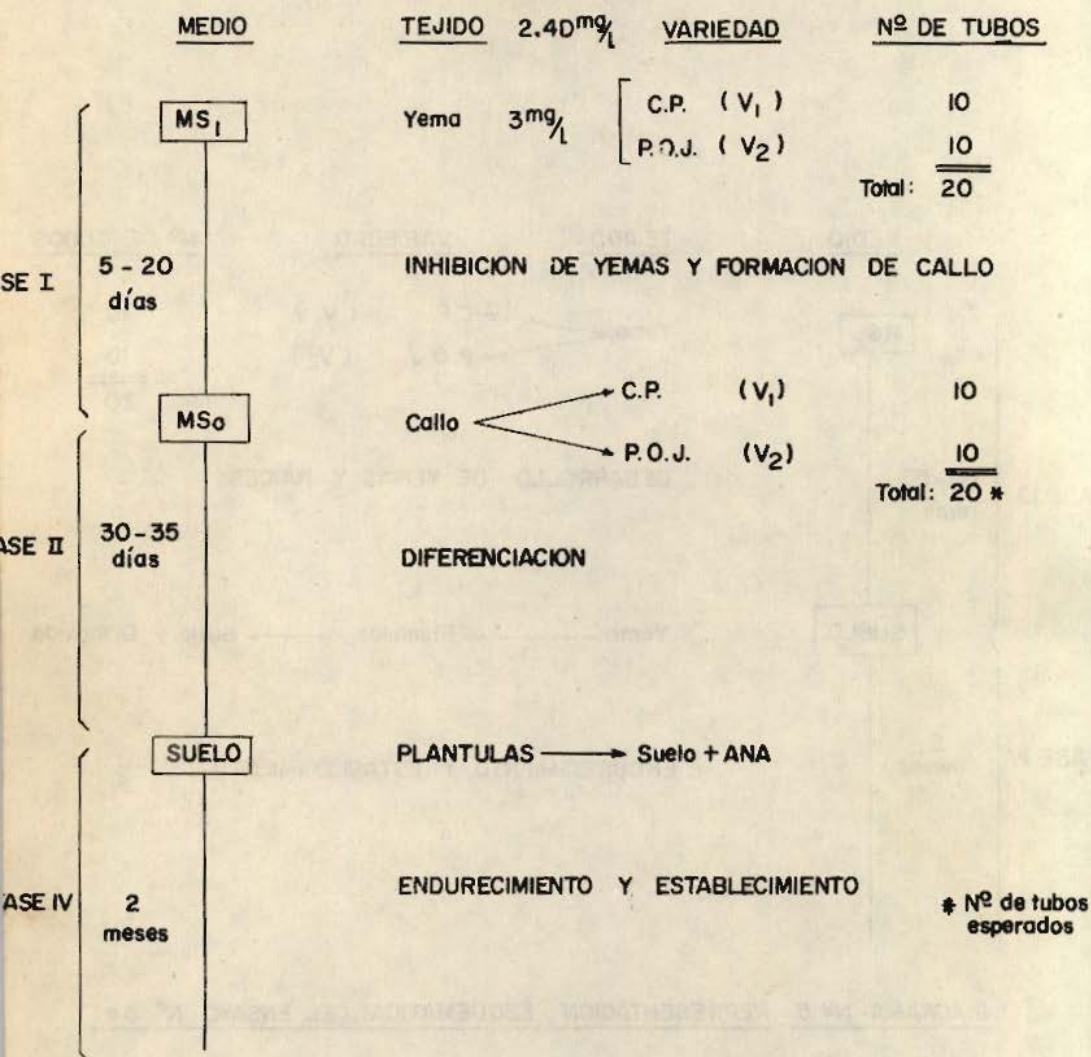


DIAGRAMA Nº 6 - REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ENSAYO 3 d.

Los testigos se comportaron así: tejido foliar 80o/o y parenquimatoso 45o/o. El comportamiento de las dos variedades fué bastante similar (C.P. 57-603, 95.5o/o y P.O.J. 28-78 99o/o).

Aunque los resultados con respecto a las concentraciones de 2,4-D (2 y 3 mgr/1) fueron muy parecidos, la variedad C.P. 57-603 tuvo una respuesta mejor con 2 mgr/1 y la P.O.J. 28-78 con 3 mgr/1 de la auxina.

La formación del callo se observó a partir del séptimo día de la siembra, ocurriendo con mayor precocidad en los tejidos cuya concentración de 2,4-D era de 3 mgr/1. A partir de la tercera semana el callo era suficientemente apto para iniciar la fase de diferenciación. Las fotografías 1 y 2 ilustran la formación del callo en el tejido parenquimatoso y foliar respectivamente.

Dados los resultados obtenidos se puede concluir que para estimular la formación de callo, las condiciones (medio nutritivo, luz y temperatura) bajo las cuales se llevó a cabo esta Fase son bastante adecuadas.

Fase II- Diferenciación

Con el tejido foliar se obtuvo un 96.5o/o de formación de plántulas mientras que con el parenquimatoso este sólo alcanzó un 19.5o/o en promedio. En los testigos no hubo diferenciación. No se presentaron diferencias significativas en cuanto al comportamiento de las dos variedades.

Los callos provenientes del tratamiento con 3 mgr/1 de 2,4-D y tejido foliar en ambas variedades fueron los mejores (100o/o de éxito) pero el comportamiento del tratamiento con 2 mgr/1 de 2,4-D fué también bueno (93o/o).

La diferenciación fué aparente desde la primera semana del trasplante al medio MSO, en la segunda semana aparecen los primordios foliares y entre la tercera y cuarta semana se tiene un desarrollo completo de las plántulas. Fotografía No. 3. En algunos tubos aparecieron primordios radiculares pero de poco vigor. A partir de la sexta y octava semana se empezó el trasplante a suelo. El promedio de plántulas obtenidas por tubo fué de 30 a 40, entre las cuales y por razones obvias se presentó una competencia quedando al final de 5 a 10 plántulas vigorosas al momento del trasplante. Se recomienda hacer subdivisiones de las células en proceso de diferenciación cuantas veces sea necesario para aprovechar al máximo éste material.



Fig. 1.- Callo formado a partir del tejido parenquimatoso a los 30 días después de la siembra. Se nota la coloración blanca cristalina de las células y su formación en la parte superior del corte.

Foto: CEMAPAL



Fig. 2.- Formación de callo en tejido foliar. Se aprecia su origen en los bordes del corte.

Foto: CEMAPAL

El primer síntoma visual de células en proceso de diferenciación es el cambio de color blanco o amarillo cristalino a blanco cremoso. Estas células entre la primera y segunda semana se tornan verdes apareciendo enseguida los brotes aéreos (Fotografía No. 3).

El bajo porcentaje de diferenciación obtenido con el tejido parenquimatoso en comparación con el tejido foliar puede ser debido a los siguientes aspectos:

- a) Las células que componen el tejido foliar utilizado están en una etapa de especialización menos avanzada que las del tejido parenquimatoso.
- b) Las células en etapas avanzadas de especialización pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la diferenciación de las células del callo, que son las que originan las nuevas plantas.

Aunque se obtuvieron buenos resultados con el tejido foliar, indicándonos la bondad de la técnica empleada, es importante resaltar la escasa y lenta formación de raíces, que originó un bajo porcentaje de prendimiento en el transplante. Hecho que obligó a los autores a hacer un segundo ensayo para superar este inconveniente.

Fase IV - Transplante a suelo.

Como se observa en el Cuadro No. 1, con la variedad C.P. 57-603 se obtuvo un 29% de éxito y con la P. O. J. 28-78 sólo se obtuvo un 7%.

Las razones de éste bajo porcentaje de éxito al transplante se debieron a: a) a la escasa o nula formación de raíces en las plántulas diferenciadas y b) a la forma como fué esterilizado el suelo (aire seco a 250°C).

Aunque se hicieron tratamientos al momento del transplante para estimular el desarrollo radicular con Hormonagro y con una solución de 5 mgr/l de ANA, no se obtuvieron resultados debido al error en la esterilización del suelo.

Ensayo No. 2

Como consecuencia de las experiencias obtenidas del primer ensayo se planeó este segundo. Trabajando únicamente con 3 mgr/l de 2,4-D y tejido foliar y adicionándole al medio nutritivo 5 ó 6 mgr/l de ANA en la fase de enraizamiento; el objetivo principal era promover el desarrollo radicular de las plántulas obtenidas.

CUADRO No. 1

RESULTADOS DE LA FORMACION DE CALLOS, DIFERENCIACION Y EXITO AL TRANSPLANTE
EN LAS DOS VARIEDADES, TEJIDOS UTILIZADOS Y CONCENTRACION DE 2,4-D (Ensayo No. 1)

Variedad	Tejido	Concentración 2,4-D mgr/l	F A S E I			F A S E II			FASE IV		
			No. Tubos	Exito Callo	o/o Exito	No. Tubos	Exit. Dif.	o/o Exito	Exito Trans.	o/o Exito	
C.P. 57-603 (V1)	Parénquima	0 (Testigo)	10	6	60	5	0	-	-	-	
		2	20	20	100	10	2	17	0	-	
		3	19	19	100	14	3	21	0	-	
	Foliar	0 (Testigo)	10	8	80	7	0	-	-	-	
		2	25	25	100	14	13	93	2	15	
		3	22	18	82	7	7	100	3	43	
	P.O.J. 28-78 (V2)	Parénquima	0 (Testigo)	10	3	30	2	0	-	-	-
			2	22	22	100	10	3	30	0	-
			3	16	16	100	10	1	10	0	-
Foliar		0 (Testigo)	10	8	80	5	0	-	-	-	
		2	25	24	96	15	14	93	2	14	
		3	23	23	100	6	6	100	0	-	



Fig. 3. - Diferenciación en tejido foliar. Se observa: células blancas cristalinas, células blancas cremosas y la aparición de primordios foliares.

Foto: CEMAPAL

+

En el Cuadro No. 2 y Diagrama 7 se ilustran los resultados de este ensayo, para cada una de las fases y concentraciones de la hormona.

La variedad C. P. 57-603 superó ligeramente a la variedad P. O. J. 28-78 en las fases de formación de callo y trasplante. En las fases de diferenciación y enraizamiento esta variedad también fué superior en su comportamiento pero las diferencias fueron mayores; diferenciación 86.2 y 67.6 y enraizamiento 92,3^o/o y 75^o/o respectivamente.

Los cuadros 2 y 3 nos muestran que la concentración de 6 mgr/1 de ANA dió una mejor respuesta para la formación de raíces. Es de anotar que además de un porcentaje alto de enraizamiento éstas tuvieron un crecimiento más rápido y en mayor cantidad.

La iniciación de raíces en los callos diferenciados se observó a partir de la primera semana, ocurriendo con mayor precocidad en los tubos donde la concentración de la hormona era de 6 mgr/1. De 60 a 80 días de iniciado el cultivo las plántulas tenían el vigor suficiente para ser transplantados a suelo. Fotografía No. 4.

En cuanto al trasplante a suelo se obtuvieron resultados muy aceptables: para la variedad C. P. 57-603, 88.9^o/o y para la P. O. J. 28-78, 83.9^o/o. Exito que se logró gracias a la experiencia del primer ensayo y al mejoramiento del método empleado.

Las plántulas fueron sembradas en un sustrato compuesto de 50^o/o de arena y 50^o/o de suelo de cultivo. No se efectuó ningún tipo de esterilización al suelo. Para prevenir el ataque de hongos se asperjaron con orthoxide 50 (ingrediente activo Capthan 75^o/o) a una concentración de 1:1000 y una sola aplicación. Las plántulas antes de la siembra fueron lavadas cuidadosamente para eliminar los residuos de agar y solución nutritiva. La Fotografía No. 4 ilustra las diferentes fases que se siguieron en este ensayo y la Fig. 5 una plántula a los 65 días lista para el trasplante a suelo.

Ensayo No. 3

En este ensayo se pretendió adaptar una técnica para la micropropagación de la caña de azúcar a partir de yemas axilares. Los resultados para éste ensayo se ilustran en el Cuadro No. 4 y Diagrama 8.

Este ensayo se caracterizó por la rapidéz en el desarrollo de la yema, ya que el tiempo requerido en obtener una planta para el trasplante fué de sólo 30 días. Su desventaja fué la falta de desarrollo radicular, lo que ocasionó que el porcentaje de éxito al trasplante fuera el más bajo



Fig. 4. - Secuencia del desarrollo del Ensayo No. 2 de izquierda a derecha: formación del callo, diferenciación, enraizamiento, endurecimiento y establecimiento.

Foto: O'Albert

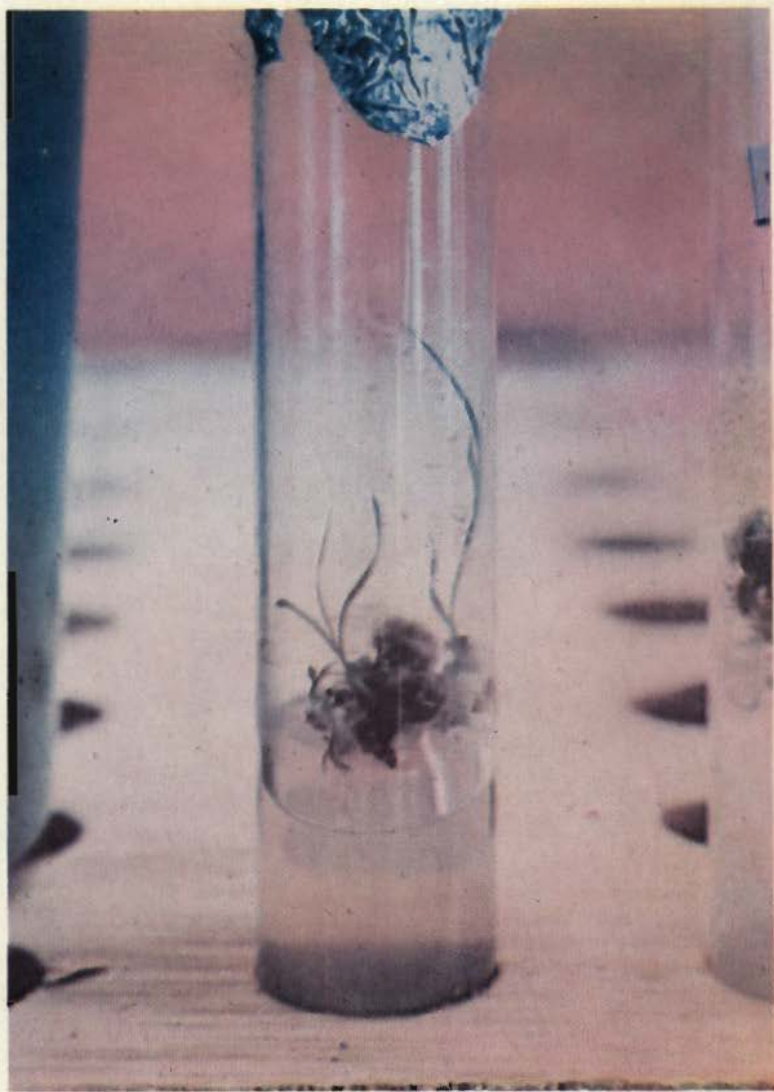


Fig. 5. - Plántulas enraizadas del Ensayo No. 2 a los 65 días, lista para el trasplante.

Foto: O'Albert

CUADRO No. 2

RESULTADOS EN LA FORMACION DE CALLOS, DIFERENCIACION, INDUCCION DE RAICES CON DOS CONCENTRACIONES DE ANA Y TRANSPLANTE CON TEJIDO FOLIAR (ENSAYO No. 2)

Variedad	F A S E I			F A S E II			F A S E III			F A S E IV			
	No. tubos	Exito callo	o/o éxito	No. tubos	Exito difer.	o/o éxito	Con. ANA mg/1	No. tubos	Exito raíces	o/o éxito	No. Transp.	Exito Transp.	o/o éxito
C;P. 57-603 (V1)							5	19	17	89.5			
	60	60	100	58	50	86.2					18	16	88.9
							6	20	19	95			
P.O.J. 28-78 (V2)							5	19	13	68.4			
	60	54	90	34	23	67.6					18	15	83.3
							6	17	14	82.4			

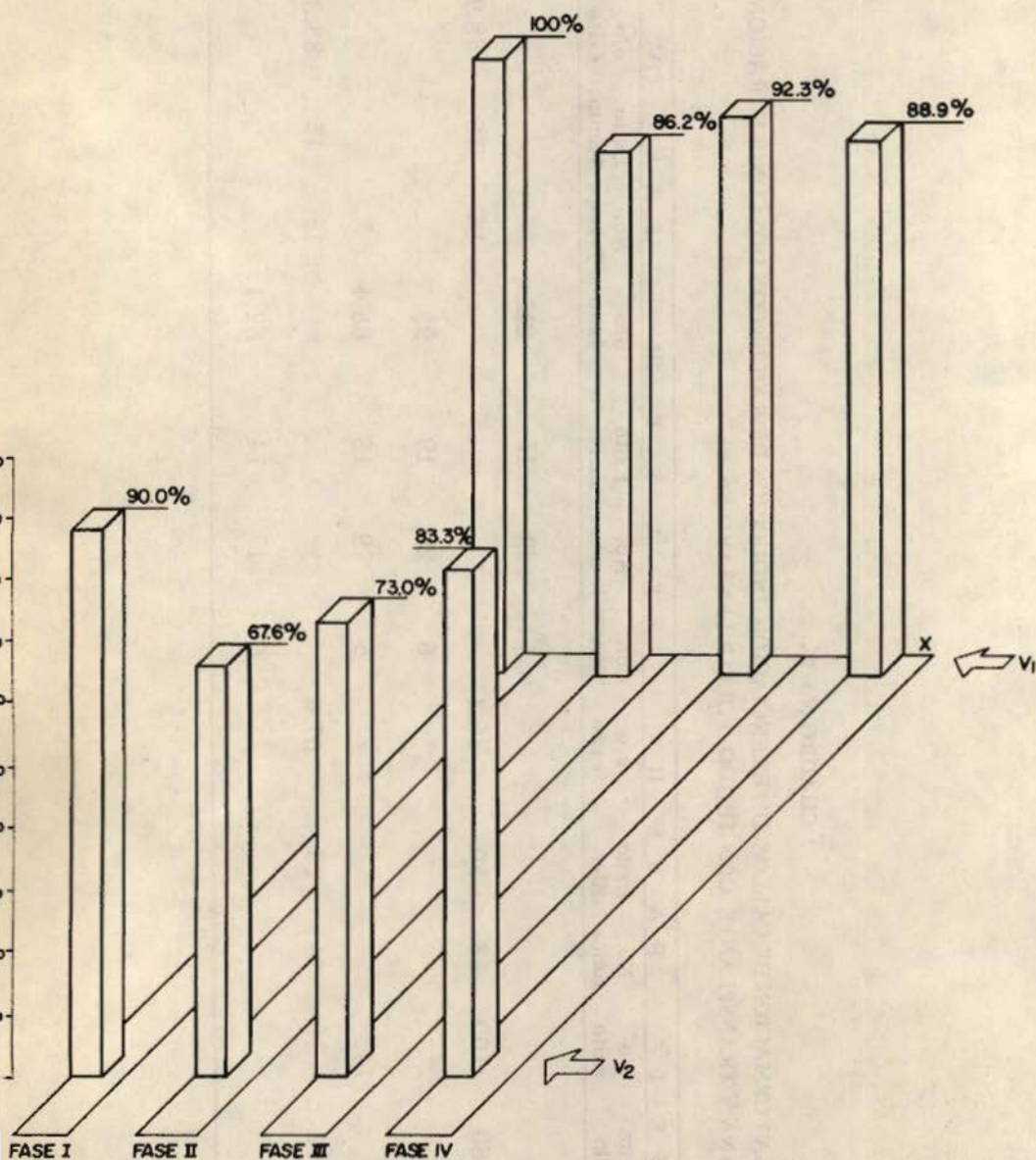


DIAGRAMA Nº 7 - RESULTADOS DEL ENSAYO Nº 2 EN CUANTO A FORMACION DE CALLO, DIFERENCIACION, INDUCCION DE RAICES Y TRANSPLANTES EN LAS VARIEDADES: CP 57-603 (V₁) y P.O.J. 28-78 (V₂)

CUADRO No. 3

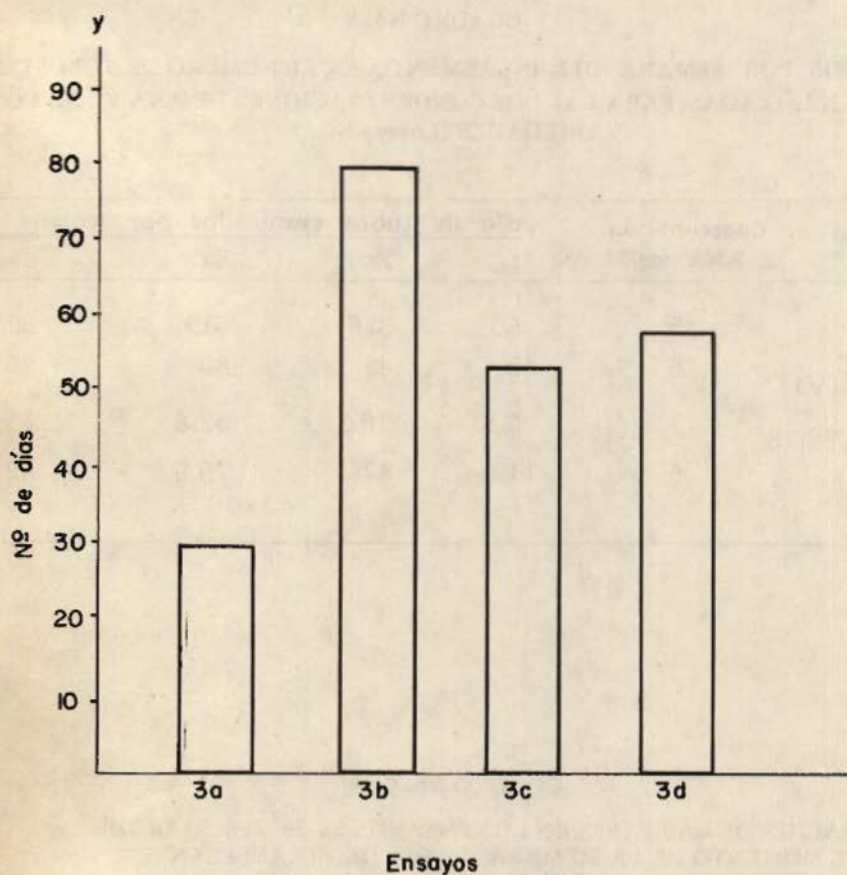
RESULTADOS POR SEMANA DEL INCREMENTO EN EL NUMERO DE TUBOS CON PLANTAS ENRAIZADAS, PARA LAS DOS CONCENTRACIONES DE ANA Y LAS DOS VARIEDADES (Ensayo No.2)

Variedad	Concentración ANA mg/l	o/o de tubos enraizados por semana			
		1a.	2a.	3a.	4a.
C.P. 57-603 (V1)	5	5.3	31.6	68.9	89.5
	6	10	45	80	95
P. O. J.28-78 (V2)	5	5.3	26.3	52.6	68.4
	6	11.8	47	70.6	82.4

CUADRO No. 4

DURACION DE LAS FASES EN LOS ENSAYOS 3a, 3b, 3c y 3d DESDE EL MOMENTO DE LA SIEMBRA AL DIA DEL TRANSPLANTE (Fase IV)

Ensayos	No. de días siembra - transplante			
	Fase I	Fase II	Fase III	Total
3a		30		30
3b		20	60	80
3c			55	55
3d	20	40		60



Ensayo 3a incluye FASES II y IV

Ensayo 3b incluye FASES II; III y IV

Ensayo 3c incluye FASES III y IV

Ensayo 3d incluye FASES I; II y IV

**DIAGRAMA Nº 8 - COMPARACION EN TIEMPO DE LOS ENSAYOS
3a; 3b; 3c, y 3d DE LA SIEMBRA AL TRANSPLANTE**



Fig. 6.- Yema en proceso de desarrollo y enraizamiento. (Ensayo 3c).

Foto: CEMAPAL

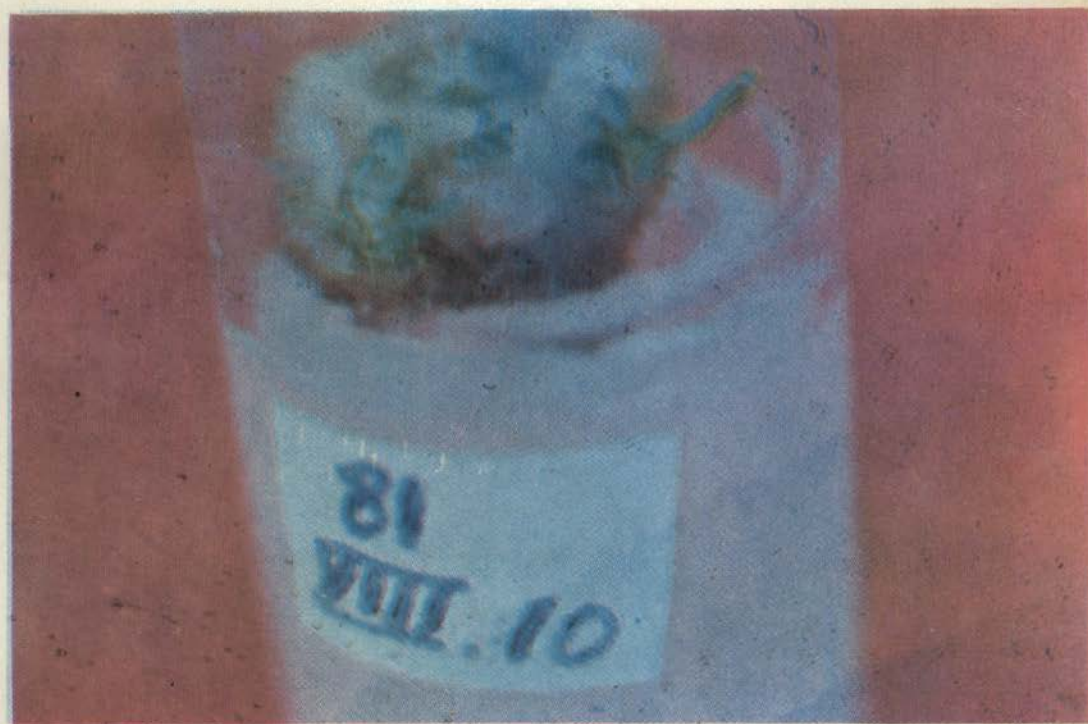


Fig. 7. - Cultivo de yemas. Ensayo No. 3d. Se ilustra la inhibición del desarrollo de la yema (parte superior), formación de callo y diferenciación de éste.

Foto: CEMAPAL

En el ensayo 3b fué evidente la lentitud en el desarrollo de la yema, su duración fué de 80 días. Las raíces se formaron a partir de la tercera y cuarta semana.

En el ensayo 3c hubo una rápida formación de raíces (entre los 15 y 18 días después de la siembra), posteriormente las yemas fueron desarrollándose hasta alcanzar el vigor necesario para el trasplante a los 55 días. Fotografía No. 6.

La principal particularidad del ensayo 3d fué la inhibición total de la yema causada por la presencia del 2,4-D; ello hizo que a la altura del corte, se iniciara una rápida y abundante formación de callo, que posteriormente se diferenció cuando se transplantó al Medio MSo (sin 2,4-D) Fotografía 7.

En razón a lo anterior el ensayo 3c presentó mejores características para esta micropropagación ya que su porcentaje promedio de éxito en las dos variedades fué de 66.25o/o comparado con 30o/o del ensayo 3. (Cuadro No.6). Aunque el ensayo 3b tuvo un comportamiento similar al No. 3c en referencia al porcentaje de éxito (61.2o/o) queda en desventaja con éste debido a su lentitud y manejo.

No se efectuó ninguna comparación entre la propagación por yemas y la de cultivo de tejidos puesto que no se puede llegar a una recomendación estricta de qué método es el mejor. Puesto que los objetivos de la investigación que se plantee determinarán qué método se debe emplear. Por ejemplo, si el objetivo es propagación masiva, selección de sub-clones, inducción de mutaciones es más conveniente el cultivo de tejidos, si se desea obtener plantas libres de patógenos, el método recomendado es la micropropagación por yemas.

CONCLUSIONES

1. El tejido parenquimatoso fué el más apto para la formación del callo.
2. El tejido foliar fué el más eficiente para la micropropagación de la caña de azúcar debido a su gran capacidad de diferenciación.
3. Con la concentración de 3 mgr/1 de 2,4-D se obtuvieron los mejores resultados para la formación del callo.
4. La rizogénesis con 6 mgr/1 de ácido naftalenacético (ANA) es más precóz y abundante.

5. La variedad C.P. 57-603 responde mejor que la P.O. J. 28-78 en las fases de diferenciación y enraizamiento.
6. Para la micropropagación por yemas se obtuvieron mejores resultados combinando las fases de enraizamiento y trasplante únicamente.

Los autores basados en los resultados obtenidos recomiendan para futuros trabajos de investigación de caña de azúcar en nuestro medio, trabajar con tejido foliar, utilizar la solución nutritiva MS₁ con 3 mgr/l de 2,4-D para la formación del callo, para la diferenciación usar la MS₀ y para el enraizamiento la MS₂ con 6 mgr/l de ANA y transplantar a suelo sin esterilizar tomando las debidas precauciones respecto al endurecimiento de las plántulas y ataques de patógenos.

BIBLIOGRAFIA

1. ADRIAN, M. Srb. Genes, Enzymes, and populations. New Jersey. Plenum Press, 1973. pp. 109-128.
2. ANTONI, H.J. Obtención de nuevos clones de caña de azúcar a partir de tejidos somáticos mediante cultivo "in vitro". La Hacienda. Sept. 28-29. 1975.
3. GAMBORG, L.O. and R. L. WETTER. Plant tissue methods. Ottawa National Research Council of Canada, 1975. 109 p.
4. HEINZ, D.J. and E. W. P. MEE. Plant differentiation from callus tissue of Saccharum species. Crop. Sc. 9:346-348. 1969.
5. HEINZ, D. J., C. MAHESHWARI and L. G. NICKELL. Chromosome numbers of some Saccharum species hybrids and their cell suspension cultures. Am. J. Bot. 56: 450-456. 1959.
6. HENDRE, R. R., A. F. MASCAREMHAS and A. L. NADGIR. et.al. Growth of mosaic virus free sugarcane plants from apical meristems. Indican Phytopathology. 28: 175-178. 1975.
7. KRISHNAMURTHI, M. and J. TLASKAL. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* L. var. Pindar Subclones from tissue culture. Proc. Int. Soc. Sugarcane Technical 15: 130 - 137. 1974

8. LIV, MING-CHIN and WEN-HUEICHEN. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. I creation of Genetics variation through callus culture. *Eug Euphytica* 25: 393-402. 1976.
9. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* 15: 173-197. 1962.
10. NADAR H. M. and D. J. HEINZ. Root and Shoot development from sugarcane callus tissue. *Crop. Sc.* 17:814-816. 1977.
11. NICKELL, L. G. Tissue and cell cultures of sugarcane another research tool. *Hawaii Planters. Rec.* 57: 223-229. 1964.
12. NICKELL, L. G. Crop improvement in sugarcane: studies using in vitro methods. *Crop. Sc.* 17: 717-719. 1977.