

La producción de caña semilla de alta calidad comienza en el laboratorio

Aldo S. Noguera, Nora del V. Paz, M. Elena Díaz, M. Francisca Perera, Milena Sepúlveda Tusek, M. Paula Filippone, y Atilio P. Castagnaro

Introducción

Se entiende por “caña semilla” de alta calidad a un fragmento de tallo de la caña de azúcar (estaca) correspondiente a un genotipo específico y determinado que posee yemas vigorosas y que está libre de plagas y enfermedades. La brotación de las yemas en el campo originará lo que se denomina “caña planta”. La “caña semilla” de alta calidad que llega a manos del agricultor, es el producto final de un proceso que comienza en el laboratorio donde se cultivan plántulas *in vitro*, es decir, se obtienen pequeñas plantas en frascos de vidrio (sanas y de pureza genética garantizada), las cuales se denominan vitroplantas. Esto es posible debido a la utilización de una herramienta biotecnológica llamada cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Genéricamente, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales implica el cultivo de células, tejidos u órganos de la planta en un medio nutritivo artificial, en condiciones de asepsia y en un ambiente controlado. Esta técnica, basada en el concepto de “totipotencia” celular que establece que de una célula se puede regenerar un organismo completo, fue incorporándose en forma acelerada en la agricultura moderna. Esto es debido a que ofrece múltiples aplicaciones dentro de la mejora genética como así también en la obtención de plantas libres de patógenos y la multiplicación rápida y masiva de plantas (esta última conocida como micropropagación).

Alrededor del año 2000, el sector cañero tucumano atravesaba una situación sanitaria crítica, causada por la alta incidencia de enfermedades sistémicas. El tratamiento de la “caña semilla” mediante hidrotermoterapia fue una de las medidas adoptadas para afrontar la problemática. Esta tecnología por sí sola no resolvió el problema, ya que si bien tiene buena eficiencia para el control de las enfermedades bacterianas, no es efectiva para las virales. Esto se veía agravado por el hecho de que en ese entonces solamente podían acceder a dicha tecnología una baja proporción de los productores tucumanos. Es así, que la utilización del cultivo de “meristemas” (o de ápices meristemáticos), que se ha aplicado en muchas especies vegetales para la

erradicación de virus y otros patógenos (Ashmore, 1997), permitió resolver el problema sanitario de la “caña semilla” y, como consecuencia mejorar características agronómicas tales como brotación, macollaje y rendimiento cultural.

Los meristemas son un grupo de células indiferenciadas que se encuentran en continua división en los ápices de crecimiento (radiculares y caulinares) y como no poseen tejido vascular, están relativamente aislados del resto de la planta. Esta es la razón principal por la que se utiliza el cultivo *in vitro* de meristemas para la obtención y posterior propagación rápida de plantas (micropropagación), las cuales tienen mayores probabilidades de estar libres de patógenos, fundamentalmente debido a que la mayoría de los endo-patógenos (virus y bacterias) se movilizan por los haces vasculares. Otro de los motivos en los que se fundamenta el empleo de esta metodología para el saneamiento vegetal es la distribución irregular de los patógenos en la planta, ya que la cantidad de los mismos disminuye progresivamente hacia el meristema donde existe una elevada concentración de fito-hormonas y las células se encuentran en constante y rápida división (Hernández, 1997). De esta forma, la implementación de un proceso sistemático en el cual se combinó el cultivo de meristemas con la hidrotermoterapia y el confinamiento y seguimiento de las plantas “madres” proveedoras de meristemas, permitió la producción masiva de “caña semilla” de excelente calidad (Ramallo *et al.*, 2001). Para evaluar y garantizar la sanidad del material vegetal que proviene del cultivo *in vitro*, es fundamental disponer de un sistema de diagnóstico de alta sensibilidad que permita valorar los bajos niveles de carga patogénica que este tipo de material normalmente posee. En la Sección Biotecnología de la EEAOC se optimizaron protocolos de diagnóstico molecular para cada una de las enfermedades sistémicas de mayor incidencia en el cultivo de la caña de azúcar (ver capítulo sobre enfermedades sistémicas), basados en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa ó PCR (del inglés, “Polymerase Chain Reaction”), los cuales fueron incorporados en el esquema anual y rutinario de

producción de vitroplantas de caña de azúcar. Cada año de producción, tanto las vitroplantas como las plantas madres, son examinadas para evaluar la presencia de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* y *Xanthomonas albilineans*, causantes de dos enfermedades bacterianas: el raquitismo de la caña soca o RSD (del inglés, "Ratoon stunting disease") y la escaldadura de la hoja o LS (del inglés, "Leaf scald"), respectivamente; asimismo, se evalúa la presencia de los virus SCMV (del inglés, "Sugarcane mosaic virus") y SrMV (del inglés, "Sorghum mosaic virus"), agentes etiológicos de la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar.

Desde su inicio, el proceso de laboratorio ha sido sometido a constantes ajustes con el propósito de maximizar la calidad del producto final. En este sentido, en 2007 se incorporó la evaluación de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares, lo cual constituyó un acontecimiento de vital importancia para asegurar la pureza genética (identidad del genotipo) de los genotipos micropropagados. La incorporación de esta evaluación fue imprescindible ya que el cultivo de tejidos ocasionalmente induce la aparición de cambios en el genoma (eventos mutacionales), como consecuencia de que las condiciones *in vitro* imponen cierto estrés a las células sometidas a cultivo (Phillips *et al.*, 1994). Tales cambios, descritos por primera vez por Larkin y Scowcroft en 1981 y denominados variación somaclonal, se transmiten a las plantas regeneradas y a su progenie. Los cambios producidos en el genoma pueden afectar caracteres morfológicos y/o bioquímicos (Larkin y Scowcroft, 1981), entre los cuales pueden estar involucradas importantes características agronómicas. La variación somaclonal es uno de los principales inconvenientes de la micropropagación comercial de cultivares donde se debe garantizar la pureza genética (Soniya *et al.*, 2001). Esto último implica que el material micropropagado debe responder en un 100% al tipo genético de la variedad que se está multiplicando (Ahmed *et al.*, 2002). El cultivo *in vitro*, no sólo sirve para la micropropagación de cultivares establecidos, sino también para la difusión masiva y rápida de nuevas variedades y/o clones promisorios producidos en el marco del Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar (PMGCA) de la EEAOC.

Fases de la producción de vitroplantas

Las vitroplantas son producidas en el laboratorio empleando protocolos optimizados para cada genotipo de manera que puedan lograrse plantas de excelente vigor. El proceso se divide en dos fases principales: (1) cultivo de meristemas y micropropa-

gación y (2) evaluación de la pureza genética y calidad fitosanitaria.

1- Cultivo de meristemas y micropropagación

La obtención de vitroplantas propiamente dicha consta de 5 etapas:

1.1 Etapa 0: Preparación del material vegetal de partida o donante.

1.2 Etapa 1: Establecimiento del cultivo *in vitro* o introducción.

1.3 Etapa 2: Multiplicación.

1.4 Etapa 3: Enraizamiento.

1.5 Etapa 4: Aclimatación.

1.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal de partida

Los genotipos que se multiplican cada año, se eligen en base a la demanda del sector productivo y a las recomendaciones propuestas por los técnicos de la EEAOC. Con esto se pretende aumentar la diversidad de genotipos en la producción a fin de disminuir los riesgos asociados al uso de un número reducido de variedades.

Una vitroplanta se inicia con la implantación (o introducción) *in vitro* de un meristema apical en un medio artificial. Los meristemas se extraen de plantas madres, donantes o donadoras, las cuales conforman el Banco de Plantas Madres constituido por un conjunto de individuos de excelente calidad agronómica y sanitaria (Fig. 1). Esta colección de genotipos, que se renueva cada 3 años, se mantiene en un invernáculo con malla antiáfidos, con cuidados nutricionales y fitosanitarios adecuados. Cabe aclarar que este esquema de mantenimiento trianual del Banco de Plantas Madres fue incorporado en el año 2006 y permitió facilitar el trabajo, disminuir costos y asegurar la calidad de la planta donadora, especialmente en el aspecto sanitario.



Figura 1. Plantas madre o donadoras de meristemas en el invernáculo de la Sección Biotecnología de la EEAOC.

Otras ventajas son la escasa producción de compuestos fenólicos causantes de la oxidación del medio de cultivo y la baja contaminación bacteriana con posterioridad a la siembra. El establecimiento de la planta madre se realiza a partir de estacas uninodales (con una yema), las cuales se someten a un tratamiento de hidrotermoterapia a 50°C durante 2 horas. Este tratamiento permite el control eficiente de las dos enfermedades bacterianas (escaldadura y raquitismo) y fue optimizado en nuestro laboratorio a partir de resultados de otros investigadores que ensayaron tratamientos que no fueron efectivos para el control simultáneo de ambas enfermedades (Comstock y Irey, 1992).

Así por ejemplo Ramallo *et al.*, (2001), utilizan 51°C durante 1h, para disminuir la incidencia de RSD, mientras que Comstock y Irey (1992) describen un tratamiento de 50°C durante 3 horas para escaldadura. El éxito de la termoterapia consiste en ajustar una combinación adecuada de tiempo y temperatura para eliminar al patógeno mediante la destrucción de sus enzimas y proteínas, sin dañar al hospedante.

1.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo

En esta etapa se establece el cultivo inicial o primario a partir del cual comienza el proceso de multiplicación. El meristema que se utiliza para iniciar la micropropagación es el apical y es obtenido de los ápices caulinares de plántulas de aproximadamente 30 días de brotación, provenientes de la plantación de estacas uninodales extraídas de las plantas madres. Una vez cortados los ápices son despojados de las hojas expandidas y algunas vainas envolventes, hasta lograr un cilindro de alrededor de 0,7 cm de diámetro y 5 cm de longitud (Fig. 2). Los cilindros se lavan inmediatamente con agua jabonosa para después proceder a su

desinfección química, que consiste en la inmersión de los ápices en hipoclorito de sodio al 1,1% durante 20 minutos y luego se realizan 3 enjuagues finales con agua destilada estéril.

Una vez desinfectado el ápice caulinar, se obtiene el ápice meristemático (o explanto a sembrar) eliminando las vainas que lo recubren hasta llegar a un tejido de aproximadamente 3 a 5 mm de longitud, el cual es cortado en la base y colocado en forma invertida en tubos de ensayo con un medio de cultivo que tiene concentraciones adecuadas de sales, vitaminas y hormonas (Fig. 3). Cada meristema implantado constituye una "línea de cultivo" que es identificada con un número, lo que a su vez permite conocer las plantas originadas a partir de cada meristema y le brinda trazabilidad al proceso de micropropagación. Los explantos se incuban durante 7 días en oscuridad a 26°C para disminuir la oxidación fenólica y asegurar la implantación y posteriormente se cultivan en una cámara de cría con un fotoperíodo de 16 h (2000 lux) hasta la formación del brote. Esta etapa tiene una duración promedio, en función del genotipo, de 30 días.



Figura 2. Preparación y desinfección de los ápices de caña de azúcar para su posterior implantación.

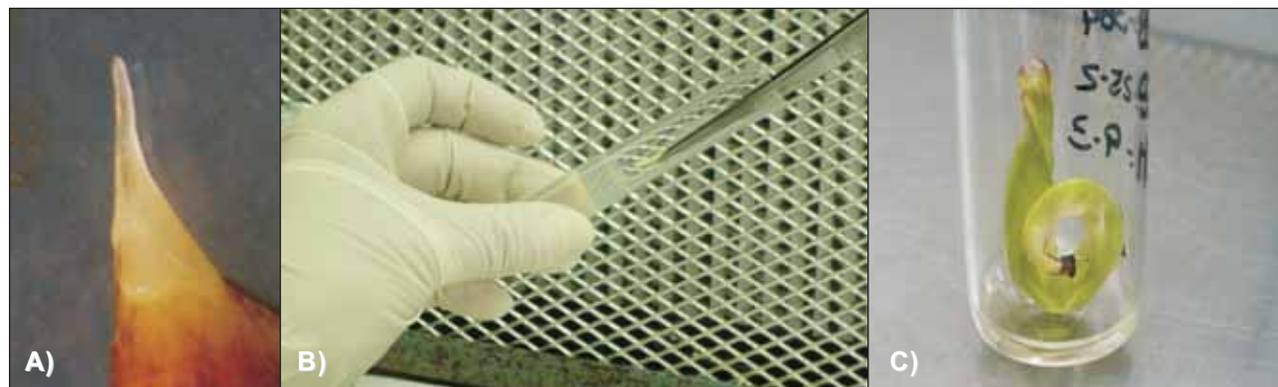


Figura 3. Establecimiento del cultivo *in vitro*. A: meristema de caña de azúcar. B: implantación de un ápice meristemático en medio de cultivo. C: ápice meristemático luego de 10 días de su implantación.

1.3. Etapa 2: Multiplicación

En esta etapa se induce la proliferación masiva de nuevos brotes a partir del primer brote originado del meristema implantado en la etapa anterior (Fig. 4). Para ello se utiliza un medio de cultivo enriquecido con hormonas del tipo citocininas que estimulan la formación de brotes (macollaje), los que periódicamente son subdivididos (sub-cultivados) en grupos de 3 a 4, colocándolos en un medio de cultivo fresco para iniciar un nuevo ciclo de macollaje. En general, cada ciclo tiene una duración aproximada de 30 días y como máximo se realizan 6 sub-cultivos para minimizar la posibilidad de generar variantes somaclonales. La etapa de multiplicación es la de mayor duración en el proceso de micropropagación y es en ella donde se produce el incremento exponencial del número de plantas. Normalmente, en esta etapa no hay formación de raíces, las que son inducidas recién en la siguiente etapa. El número potencial de brotes que se pueden obtener a partir de un meristema es elevado, aunque depende del genotipo y del número de sub-cultivos que se realicen.

Con la intención de reducir las probabilidades de ocurrencia de variación somaclonal, en nuestro laboratorio se ha fijado un rendimiento promedio relativamente bajo, de entre 1.600 a 1.800 plantas por meristema al final de la Etapa de Multiplicación.

En esta etapa 2, entre el primer y segundo sub-cultivo se realiza la evaluación fitosanitaria mediante la técnica molecular de PCR, utilizando cebadores específicos para los patógenos sistémicos de mayor incidencia en Tucumán. Sólo las líneas que resultan libres de patógenos, continúan el proceso de micropropagación.

1.4. Etapa 3: Enraizamiento

Al final del proceso de multiplicación y a medida que los brotes alcanzan un desarrollo adecuado, se induce la formación de las raíces en un medio de cultivo especial sin hormonas, con mayor

concentración de sacarosa y menor concentración de sales y minerales. Este proceso dura también alrededor de 30 días, tiempo suficiente para lograr un buen desarrollo radicular, lo que es de fundamental importancia para conseguir una adaptación exitosa de la planta a las condiciones *ex vitro* (Fig. 5). Al cabo de este tiempo, las plántulas están completas y listas para ser aclimatadas.



Figura 5. Etapa de enraizamiento. Desarrollo de raíces en vitroplantas de caña de azúcar.

1.5. Etapa 4: Aclimatación

Consiste en la adaptación gradual de las pequeñas plántulas producidas *in vitro* a las condiciones ambientales de cultivo *ex vitro*: este proceso consiste en el pasaje de las mismas a un sustrato desinfectado que tiene como componentes mantillo, tierra, y un soporte inerte (perlita). Previo a la aclimatación, las vitroplantas son acondicionadas en el laboratorio lo cual consiste en la extracción de las mismas de los frascos, lavado con agua corriente para eliminar restos del medio de cultivo (y prevenir futuras infecciones), separadas y clasificadas individualmente en 4 tamaños (<3 cm; 3-5 cm; 5-7 cm y >7cm). Finalmente son colocadas en una solución con fungicidas durante 24 horas. Durante la aclima-



Figura 4. Etapa de multiplicación. A: proliferación de nuevos brotes durante la etapa inicial de la multiplicación. B: subcultivo de vitroplantas. C: vitroplantas de caña de azúcar en Etapa de multiplicación.

tación y desde el punto de vista fisiológico, la planta deja el comportamiento heterótrofo que tenía *in vitro*, para adquirir un ritmo fotosintético que le permita una vida autótrofa, regulando a su vez el balance hídrico en concordancia con el ambiente externo. Esto se debe a que las condiciones *in vitro* provocan cambios fisiológicos, morfológicos y como se dijo, a veces genéticos, que conducen por ejemplo a una baja actividad fotosintética, escasa funcionalidad de los estomas, formación de grandes espacios intercelulares y ausencia de ceras en la cutícula, lo cual, debe ser revertido durante esta etapa de aclimatación para que las plantas puedan crecer en condiciones de campo.

La aclimatación se lleva a cabo en el invernáculo del Programa de Mejoramiento de la Caña de Azúcar de la EEAOC (Díaz Romero *et al.*, 2005), en un ambiente con alta humedad relativa (HR= 80 - 100%) y baja intensidad lumínica durante las dos primeras semanas, para evitar la deshidratación; pasado este tiempo inicial, se empieza a disminuir gradualmente la HR y a aumentar la intensidad de la luz (Fig. 6). En nuestras condiciones, esta etapa crítica que define la viabilidad comercial de todo el proceso, tiene una duración promedio de 90 días.



Figura 6. Etapa de aclimatación. Vitroplantas de caña de azúcar durante la etapa de aclimatación en el invernáculo de la Sección Mejoramiento de Caña de Azúcar de la EEAOC.

2. Evaluación de la pureza genética y calidad fitosanitaria

Durante la etapa de laboratorio, las vitroplantas son evaluadas mediante técnicas moleculares para garantizar que estén libres de patógenos y que no posean alteraciones genéticas (variación somaclonal) con respecto al genotipo original. La evaluación fitosanitaria se realiza en el primer sub-cultivo de la etapa de multiplicación (etapa 2), mientras que el análisis de la variación somaclonal se lleva a cabo durante la aclimatación (etapa 4). Estos análisis fueron optimizados en la Sección Biotecnología y se

incorporaron al esquema de producción anual, sistemático y rutinario de vitroplantas, lo cual permitió mejorar la calidad de los plantines que salen del laboratorio y constituyen la base de la futura caña “semilla” de alta calidad.

Evaluación de la pureza genética

La identidad genética de las vitroplantas, es decir, que sean genéticamente idénticas al genotipo original, es otro de los atributos que se debe asegurar cuando el objetivo es la micropropagación. Esto se debe a que pueden existir diferencias genéticas preexistentes entre las células de un tejido o explanto (lo que fue citado en caña de azúcar), o como se dijo, a cambios inducidos por el cultivo *in vitro* (concentración y tipo de hormonas, tipo de explanto, número de sub cultivos, etc.). Estas variaciones se transmiten a las plantas regeneradas y a su progenie asexual y pueden afectar caracteres morfológicos, bioquímicos, de herencia simple o cuantitativa (Larkin y Scowcroft, 1981), generando las llamadas plantas “fuera de tipo”. Por consiguiente, la variación somaclonal es indeseable en la propagación agámica o clonación, por lo que es fundamental evaluar la identidad genética de los individuos resultantes.

Actualmente, existen herramientas biotecnológicas que permiten evaluar las variaciones genéticas inducidas o naturales de un genoma, como por ejemplo los marcadores moleculares. Un marcador molecular es un fragmento de ADN que tiene una ubicación específica en el genoma de un individuo o genotipo (Vos *et al.*, 1995). Mediante una reacción en la que se utiliza el ADN total del genotipo a analizar (molde) y otros reactivos específicos, se amplifican muchos fragmentos de ADN que son separados por su tamaño en un soporte físico (geles de agarosa o poliacrilamida). De este modo se obtienen los llamados “perfiles moleculares” que se visualizan en un gel como una sucesión de bandas de diferentes tamaños, las cuales son únicas y específicas para cada genotipo (Fig. 7). De esta forma, para detectar la existencia de variación somaclonal, se comparan los perfiles moleculares de las vitroplantas con el perfil que define al genotipo original. Una variación se detecta por una diferencia en los perfiles mencionados.

La evaluación de la variación somaclonal fue incorporada al esquema de producción anual de vitroplantas en 2007 con la finalidad de garantizar la pureza genética de las mismas. Las evaluaciones correspondientes a las campañas 2007-2008, pusieron de manifiesto una muy baja ocurrencia de variantes somaclonales (<1%, es decir se observaron variaciones en los perfiles en menos de un individuo por cada 100 analizados). Este resultado indica que los proto-

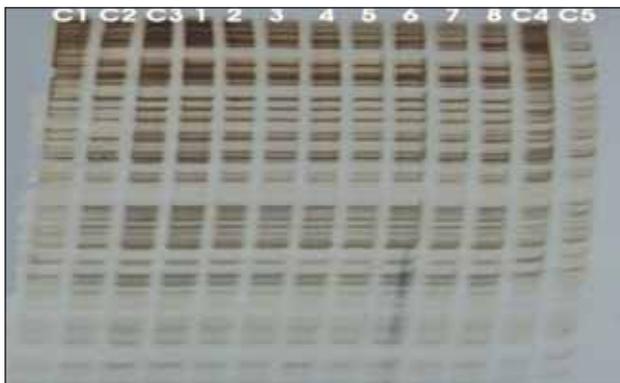


Figura 7: Gel de acrilamida mostrando los perfiles moleculares de diferentes genotipos. C1 a C5 representan los perfiles de distintos genotipos propagados convencionalmente: C1, TUCCP 77-42; C2, RA 87-3; C3, TUC 95-37; C4, CP 65-357 y C5, LCP 85-384. Líneas 1 a 8, vitroplantas del genotipo TUC 95-37 cuyo control convencional es C3.

colos de saneamiento y micropropagación optimizados en el marco Proyecto Vitroplantas, permiten asegurar la identidad genética del genotipo que se está multiplicando.

Evaluación de la calidad fitosanitaria

Los agentes etiológicos que se evalúan en el Proyecto Vitroplantas son los causantes de las tres enfermedades sistémicas de mayor incidencia en el cultivo: raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y mosaico de la caña de azúcar (SCMV y SrMV). En los primeros cuatro años del proyecto la evaluación de las vitroplantas se realizó mediante el ensayo serológico ELISA (“Enzyme-linked Immuno Sobert Assay”). Esta técnica se basa en una reacción de aglutinación específica entre un antígeno (Ag) del patógeno y su anticuerpo (Ac) generado en el suero sanguíneo de un mamífero. La utilización de anticuerpos monoclonales aumentó la especificidad y la robustez de las técnicas serológicas clásicas y permitió el diagnóstico a gran escala. Si bien las pruebas serológicas permiten acelerar el proceso de detección patogénica, su uso depende en gran medida de la disponibilidad de anticuerpos específicos. Últimamente el uso de la serología se ha visto condicionado por la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares (Comstock y Irey, 1992; Davis *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1997). Por este motivo, en el año 2005 se decidió la incorporación del diagnóstico molecular basado en la técnica de PCR, para el análisis específicamente de las plantas madres donadoras de meristemas y de las vitroplantas en etapa de laboratorio (M1). En el caso de las muestras provenientes del semillero Básico y del Registrado, el empleo de la técnica molecular no es posible por el momento debi-

do a que, por el gran volumen de muestras que se analizan, el procesamiento insumiría mucho tiempo.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR es una técnica de biología molecular diseñada y descrita en 1986 por Kary Mullis, cuya sensibilidad permite la amplificación de mínimas cantidades de ADN molde.

El primer paso del diagnóstico molecular consiste en la extracción de ácidos nucleicos genómicos de buena calidad, la que se realiza a partir de trozos de hojas de las plántulas en la etapa de multiplicación (primer sub-cultivo). Con este propósito, se emplea la técnica descrita por Aljanabi *et al.* (1999) con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio.

Para el diagnóstico de las virosis asociadas con el mosaico de la caña de azúcar, previamente a la PCR propiamente dicha, se realiza una reacción enzimática intermedia denominada retrotranscripción (RT), que transforma el ARN viral en ADN, el cual actúa como molde en la reacción de PCR. La RT solamente se aplica para patógenos con genomas de ARN, mientras que para detectar virus con genomas de ADN o bacterias, se utiliza directamente una reacción de PCR convencional. De esta forma, para el diagnóstico de SCMV y SrMV se ajustó un protocolo descrito por Yang y Mirkov (1997), mediante el cual se amplifica una banda de aproximadamente 900 pb (pares de bases), correspondiente a una región del gen que codifica para la proteína de la cápside viral (Fig. 8). Para las enfermedades bacterianas se optimizaron los protocolos

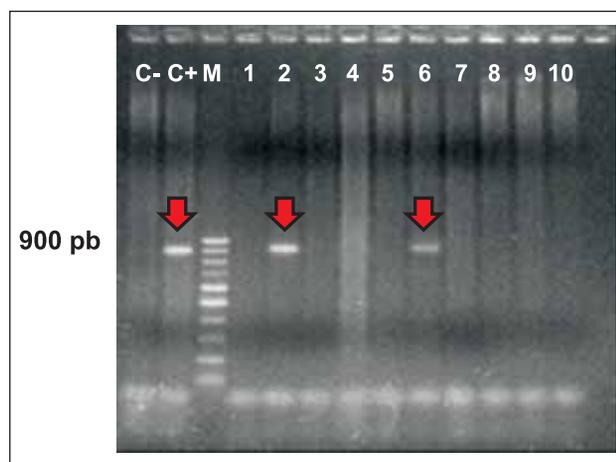


Figura 8: Diagnóstico de SCMV. Gel de agarosa mostrando los productos amplificados por PCR. C+: control positivo que contiene el fragmento de 900 pb correspondiente a una región del genoma del virus que codifica para la proteína de la cápside (flecha); C-: control negativo; 1, 3 - 5 y 7 - 10 muestras negativas; 2 y 6 muestras positivas (flecha); M: marcador de peso molecular.

descriptos por Pan *et al.* (1998, 1999), con el cual se amplifica un segmento de ADN bacteriano de 438 pb para RSD y de 288 pb para LS, respectivamente (Fig. 9).

Como se dijo anteriormente, además de evaluar las líneas establecidas *in vitro* en el primer subcultivo, anualmente también se evalúan las plantas madres donadoras de meristemas, lo que permite garantizar el estado sanitario del material de partida, y de esta forma se disminuye la cantidad de líneas descartadas por enfermedad. Desde la incorporación de esta metodología se ha reducido notablemente la incidencia de patógenos detectados en los semilleros, siendo nula en el Básico y despreciable en los Registrados y Certificados.

Producción de Vitroplantas en la EEAOC

Las dos primeras campañas de producción de vitroplantas (2001-2002) fueron realizadas en el laboratorio de la Sección Fitopatología de la EEAOC. En los primeros años del proyecto se consolidó el equipo de trabajo y se ganó en conocimiento sobre el proceso en general y el comportamiento *in vitro* en particular para así lograr la optimización de las condiciones de cultivo más adecuadas para las variedades de interés. A partir del año 2003 la producción de vitroplantas se reubicó en la Sección Biotecnología de la EEAOC, inaugurada a mediados de 2002.

En la Tabla 1 se presenta el número de vitroplantas obtenidas por cultivar en cada campaña de producción.

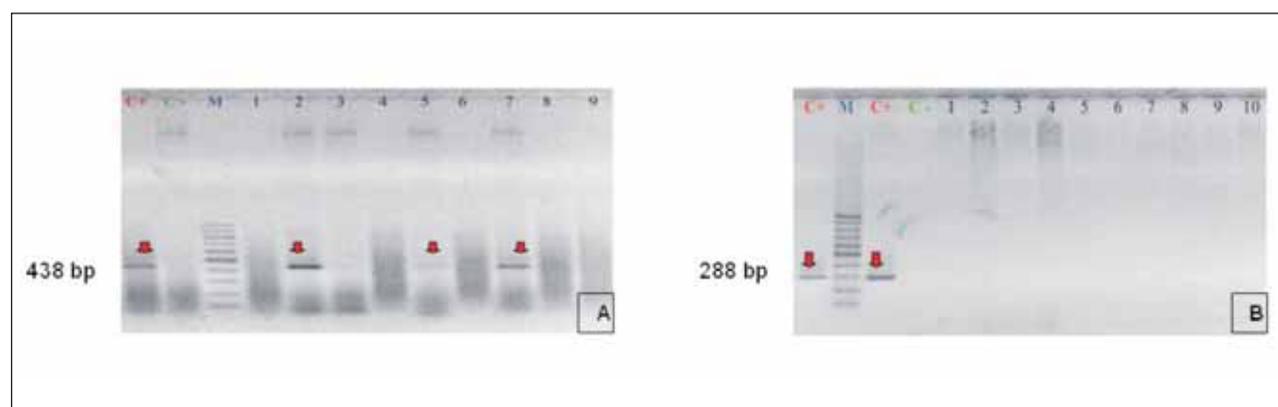


Figura 9. Diagnóstico de las enfermedades bacterianas. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR correspondiente a un fragmento de 438 pb del genoma de *Leifsonia xyli* (A); y de 288pb del genoma de *Xanthomonas albilineans* (B). Las muestras analizadas están indicadas con un número arábigo; C+ y C- corresponden al control positivo y negativo, respectivamente; M, marcador de peso molecular.

Tabla 1. Número de vitroplantas de caña de azúcar y genotipos micropropagados en el período 2001–2009.

| Genotipo | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | TOTAL |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| LCP 85-384 | 47.345 | | 3.118 | 12.275 | 10.423 | 15.401 | 12.853 | 16.326 | 16.590 | 117.741 |
| CP 65-357 | 21.547 | | 4.190 | | 2.443 | 13.324 | | | | 41.504 |
| TUC 77-42 | 1.611 | 3.091 | 3.347 | 1.071 | 7.199 | 4.960 | 8.757 | 9.890 | 8.991 | 39.926 |
| LCP 85-376 | 3.096 | 3.735 | 3.201 | | | | | | | 10.032 |
| RA 87-2 | 1.546 | 4.958 | 1.522 | | | | | | | 8.026 |
| RA 87-3 | 3.409 | 5.808 | 9.293 | 5.304 | 28.344 | 16.682 | 9.103 | 3.533 | 7.923 | 81.476 |
| L 75-33 | | | 3.223 | | 3.612 | | | | | 6.835 |
| RA 89-28 | | | | 82 | | | 10.030 | 1.424 | | 11.536 |
| RA 95-37 | | | | 317 | | | 6.360 | 6.255 | 12.660 | 12.932 |
| RA 97-8 | | | | | | | 6.239 | 11.360 | 14.562 | 17.599 |
| Clones promisorios | | | | 7.143 | 2.168 | 5.078 | 17.729 | 6.389 | 9.475 | 38.507 |
| Total | 78.554 | 17.592 | 27.894 | 26.192 | 54.189 | 55.445 | 71.071 | 55.177 | 70.201 | 386.114 |

La producción de vitroplantas es un proceso continuo e interdisciplinario cuyo beneficio ha sido comprobado y la implementación de este Proyecto ha constituido un ejemplo de investigación, desarrollo y transferencia tecnológica de la EEAOC al sector azucarero provincial.

Bibliografía citada

- Ahmed M. A., Chavanne E., Noguera A., Zavaleta J, y Scandaliaris J: 2002.** Semillero básico: primera etapa de multiplicación de vitroplantas de caña de azúcar. *Avance Agroindustrial* 23 (2): 28-30.
- Aljanabi S. M., Forget, L. and Dookun, A. 1999.** An improve and rapid protocol for isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Biol. Mol. Reporter*. 17: 1-8.
- Ashmore S. E. 1997.** Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 67 p.
- Comstock J.C. and Irey M. 1992;** Detection of sugarcane leaf scald *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA and isolation techniques. *Plant Disease* 76: 1033-1035.
- Davis, M.J., Rott, P., Baudin, P., and Dean, J.L. 1994.** Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 78:78-82.
- Díaz Romero, C.; Chavanne, E.; Cuenya, M.I.; Berardinelli, A. y Noguera, A. 2005.** Proyecto vitroplantas de caña de azúcar: resultados obtenidos entre 2001 y 2004 en las áreas de crianza en invernáculo y de manejo de semillero básico. *Avance Agroindustrial* 26(4):8-12.
- Hernández, R. 1997.** Obtención de plantas libres de patógenos. Curso Teórico-Práctico de propagación Masiva de Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. p 31-43
- Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981.** Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197-214.
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. y Erlich, H.A. 1986.** Cold Spring Harbor. *Symp. Quant. Biol.* 51:263:273.
- Pan, Y. B.; Grisham, M. P.; Burner, D. M.; Damann, K. E. and Wei, Q. (1998).** A Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the Causal Bacterium of Sugarcane Ratoon Stunting Disease. *Plant Disease* 82; 285- 290.
- Pan, Y. B.; Grisham, M. P.; Burner, D. M.; Legendre, B. L. and Wei, Q. 1999.** Development of Polymerase Chain Reaction Primer Highly Specific for *Xanthomonas albilineans*, the Causal Bacterium of Sugarcane Leaf Scald Disease. *Plant Disease*, 83; 218-222.
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhott P, 1994.** Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5222-5226.
- Ramallo, J.; Vázquez de Ramallo, N. 2001.** Aplicación de hidrotermoterapia para la obtención de caña semilla de sanidad controlada. *Revista Avance Agroindustrial* 22(2):16-18.
- Soniya EV, Banerjee NS, Das MR. 2001.** Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Cur Sci* 80:1213-1215.
- Vos, P. et al. 1995.** AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, No 21, 4407-4414
- Yang, Z. N. and Mirkov T. E. 1997.** Sequence and Relationships of Sugarcane Mosaic and Sorghum Mosaic Virus Strains and Development of RT-PCR-Based RFLPs for Strain Discrimination. *Phytopathology* 87:932-939.