

SANEAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL MEDIANTE CULTIVO DE MERISTEMOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp. híbridos) Y DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

Luis Molina¹; Carlos Maddaleno²; Victoriano Sut²; Werner Ovalle³; Salomón García⁴

¹Biotecnólogo; ²Técnico de Biotecnología; ³Fitopatólogo; ⁴Técnico de Fitopatología CENGICAÑA

RESUMEN

En este trabajo se han utilizado 23 variedades de caña de azúcar, 7 de ellas introducidas desde distintos orígenes (México, Estados Unidos y Tailandia) y el resto desarrolladas localmente en Guatemala. En las variedades introducidas se detectaron síntomas del virus del Mosaico (SCMV) y del Amarillamiento foliar (SCYP) por lo que se ha utilizado el cultivo de meristemos para la regeneración de planta sana a partir de estas plantas infectadas. Esta metodología también se ha aplicado a las variedades locales. La desinfección y tratamiento térmico de esquejes de estas variedades ha permitido obtener brotes y meristemos que se han cultivado *in vitro*. Se ha conseguido regenerar plantas a partir de todas estas variedades. En promedio, se logró un 30.82 por ciento de regeneración. Estas plantas se han analizado utilizando marcadores moleculares con el fin de descartar la presencia de los patógenos causantes de las enfermedades: Amarillamiento foliar (SCYP), Escaldadura foliar (LSD), Raquitismo de las socas (RSD) y virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV). Las plantas sanas regeneradas se utilizaron como explantes para su multiplicación *in vitro*. El número de plantas micropropagadas fue diferente para cada variedad, en promedio, se pueden obtener hasta 2000 plantas a partir de un mes del inicio de la multiplicación. Las plantas saneadas se han incorporado a distintos programas de mejora e intercambio de germoplasma.

SANEAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL MEDIANTE CULTIVO DE MERISTEMOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp. híbridos) Y DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

Luis Molina¹; Carlos Maddaleno²; Victoriano Sut²; Werner Ovalle³; Salomón García⁴

¹Biotecnólogo; ²Técnico de Biotecnología; ³Fitopatólogo; ⁴Técnico de Fitopatología CENGICAÑA

INTRODUCCIÓN:

Importancia económica de la caña de azúcar en el mundo y en Guatemala:

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es probablemente el cultivo más valioso del mundo, valuado en aproximadamente US\$ 143 mil millones por año. Cerca del 75 por ciento de la producción mundial de sacarosa proviene de la caña de azúcar que es cultivada en más de 100 países (Da Silva y Bressiani, 2005). Es además, el cultivo industrial más cercano a la sostenibilidad como fuente renovable de energía (Wu y Birch, 2007). La producción mundial de caña de azúcar durante el año 2010 se estimó en 1685 millones de toneladas, en un área de 23.8 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2010).

Guatemala es el cuarto mayor exportador de azúcar en el mundo y el tercero en productividad por hectárea. El azúcar representa el 10.38 por ciento de las exportaciones totales del país y el 20.95 por ciento de las exportaciones agrícolas, generando US\$ 505.3 millones en ingreso de divisas

durante el año 2011 (ASAZGUA, sin fecha).

Durante los últimos cinco años, las producciones de caña de azúcar en Guatemala se han mantenido alrededor de 20 millones de toneladas métricas (Cuadro 1) en un área promedio de 230,000 hectáreas distribuidas en la planicie de la costa sur (Figura 1).

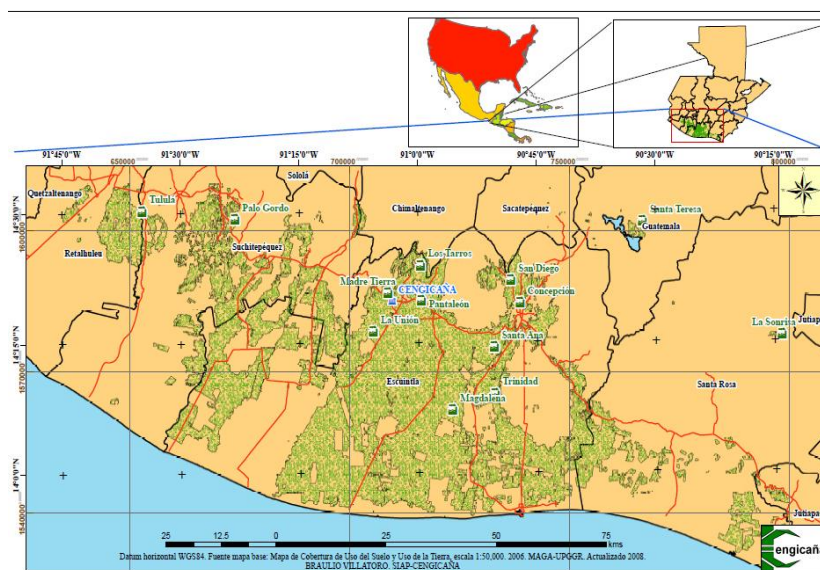


Figura 1. Ubicación geográfica de la zona cañera de Guatemala y de los ingenios azucareros

Año Zafra	Área (ha)	Caña Molida (TM)	Azúcar (TM)	Azúcar exportada (TM)	RENDIMIENTO			
					(%)	(TM/ha)	(TM/ha)	(TM/ha/mes)
2006-2007	210,000	19,813,455	2,169,890	1,505,928	10.95	96.31	10.54	0.92
2007-2008	230,000	19,697,218	2,089,396	1,439,076	10.60	87.26	9.25	0.80
2008-2009	230,000	20,156,217	2,217,332	1,582,350	11.00	91.12	10.02	0.87
2009-2010	230,000	22,530,622	2,340,837	1,685,522	10.30	102.40	10.55	0.92
2010-2011	231,505	19,219,653	2,048,142	1,303,911	10.60	88.52	9.38	0.82

Cuadro 1. Producción de azúcar en Guatemala 2006/2007 – 2010/2011 Fuente: CENGICAÑA, 2011.

Taxonomía

La taxonomía y filogenia de la caña de azúcar son complicadas pues plantas de cinco géneros comparten características comunes y forman un grupo de entrecruzamiento estrechamente relacionado conocido como “complejo *Saccharum*”. El complejo *Saccharum* se compone de *Saccharum*, *Erianthus* (Sección *Ripidium*), *Miscanthus* (Sección *Diandra*), *Narenga* y *Sclerostachya*. Estos géneros se caracterizan por altos niveles de poliploidía y número cromosómico con frecuencia desbalanceado (aneuploidía), haciendo difícil su determinación taxonómica, lo cual ha resultado en muchas revisiones previas de sus relaciones taxonómicas (Daniels y Roach, 1987).

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum*, un género complejo que se caracteriza por alta poliploidía y frecuente aneuploidía. El género *Saccharum* se compone de seis especies: *S. spontaneum* L., *S. robustum* Brandes y Jesweit ex Grassl, *S. officinarum* L., *S. barberi* Jesw., *S. sinense* Roxb., y *S. edule* Hassk. Se cree que *S. officinarum* evolucionó a partir de *S. robustum* en Java y que *S. barberi* y *S. sinense* son híbridos naturales de *S. officinarum* y *S. spontaneum* (Jannoo *et al.*, 1999).

Origen y domesticación

La caña de azúcar es originaria del sudeste asiático

y Nueva Guinea. Sus tallos maduros son capaces de acumular entre 12 – 16 por ciento de su peso fresco y alrededor de 50 por ciento de su peso seco como sacarosa (Dillon *et al.*, 2007).

La caña no llegó al Mediterráneo hasta que los árabes conquistaron Egipto y la introdujeron ahí en 641 A.C. Los portugueses la llevaron a Madeira, las Islas Canarias y a Africa Occidental. En su segundo viaje en 1493, Colón la llevó a la Española (República Dominicana y Haití). Esta caña, conocida en el nuevo mundo como “criolla” era en realidad *Saccharum barberi* y no fue sino hasta finales del siglo XVIII cuando se introdujo la caña noble *Saccharum officinarum* del lejano oriente al nuevo mundo, donde rápidamente sustituyó a la criolla debido a su rendimiento superior (Robinson, 1995).

Hasta finales del siglo XIX, *S. officinarum*, *S. sinense* y *S. barberi* proporcionaron la mayoría de cultivares cultivados comercialmente (Jannoo *et al.* 1999). Sin embargo, *Saccharum officinarum* y *Saccharum spontaneum* son las dos especies que han contribuido al origen de los actuales cultivares: *S. officinarum* ($2n = 80$) la especie productora de azúcar, conocida como “noble”, y *S. spontaneum* ($2n = 40$ a 128) una especie silvestre con gran variabilidad (D’Hont y Glaszmann, 2001).

Mejora genética de la caña de azúcar

Generalidades: El mejoramiento de la caña de azúcar a través de manipulación genética ha sido un proceso dirigido y continuo desde 1888, tras la observación en 1858 de que la caña de azúcar producía semilla viable. Los destrozos causados por enfermedades en Java motivaron a los holandeses a encontrar medidas de control, lo que resultó en programas de mejora y selección que fueron los precursores de los exitosos programas de mejoramiento actuales. La mayoría de áreas productoras de caña de azúcar cuenta con programas de mejoramiento para desarrollar variedades de adaptación local (Heinz, 1987).

De acuerdo con Lakshmanan (2005), hasta fines del siglo XIX, la mayoría de caña cultivada eran clones de *Saccharum officinarum* ($2n = 80$ cromosomas) con altos niveles de sacarosa. Uno de los principales logros en la mejora genética lo constituyeron los híbridos entre *S. officinarum* y la especie silvestre *S. spontaneum*. Una serie de retrocruzas con *S. officinarum* (proceso conocido como nobilización), resultó en cultivares con mayores rendimientos, mejor capacidad de rebrote y resistencia a enfermedades. Los cultivares modernos han sido desarrollados de estos híbridos iniciales y tienen entre $2n = 100$ y $2n = 130$ cromosomas, de los cuales 10 – 25 por ciento pertenecen a *S. spontaneum* (D’Hont *et al.* 1996).

La hibridación interespecífica entre *S. officinarum* como progenitor femenino y *S. spontaneum* como progenitor masculino produce progenies con número cromosómico triploide ($2n + n = 100-130$) (Sreenivasan citado por OGTR, 2011). Esto surge debido a que el progenitor femenino transmite $2n$ cromosomas, mientras que el progenitor masculino transmite, como es normal, n cromosomas. Esta transmisión asimétrica también ocurre la primera vez que el híbrido es retrocruzado con *S. officinarum* y se cree que ocurre a través de endoduplicación o a la fusión de dos núcleos durante la meiosis. Este fenómeno facilitó el mejoramiento de los cultivares modernos pues las cualidades del progenitor femenino se recuperaron más rápidamente en los híbridos, con lo cual se requirió menos ciclos de retrocruza para producir cultivares con alto contenido de azúcar (OGTR, 2011).

Uno de los productos de la nobilización, la variedad POJ2878 mostró un éxito tan grande que en 1929 ocupaba el 90 por ciento del área sembrada en Java y fue introducida en la mayoría de programas de investigación en caña de azúcar a nivel mundial (Lu *et al.*, 1994).

Los incrementos en producción desde el siglo XIX se han asentado en un continuo abastecimiento de cultivares mejorados que satisfacen los requerimientos de las industrias azucareras alrededor del

mundo. La mayoría de estas industrias financia programas de mejoramiento para incrementar su productividad, mediante el incremento directo del rendimiento de azúcar, a través del incremento en el rendimiento de caña y de contenido de azúcar, e indirectamente por la incorporación de resistencia genética para las principales enfermedades y plagas. Los cultivares se desarrollan utilizando tres componentes: Ensamblaje de una población caracterizada de clones progenitores; generación de progenies variables mediante polinización cruzada; y selección de clones útiles (Hogarth y Berding, 2005).

Necesidades de Mejora Genética con relación a enfermedades en Guatemala: Como se ha comentado anteriormente se han desarrollado programas para aumentar el rendimiento de azúcar, a través del mejoramiento en el contenido de azúcar y del rendimiento de caña, sin embargo, la obtención de materiales con resistencia genética a enfermedades, es muy importante para alcanzar indirectamente el incremento en el rendimiento de azúcar. La obtención de variedades resistentes implica el desarrollo y aplicación de métodos adecuados de selección y diagnóstico para las principales enfermedades que afectan al cultivo. Además, algunas de estas enfermedades son sistémicas y requieren ser eliminadas eficientemente en el establecimiento de semilleros, pues la reproducción de la caña de azúcar se realiza a través de semilla vegetativa.

En la caña de azúcar se han reportado más de 126 enfermedades en 109 países y en Guatemala se han identificado 24. Tomando en cuenta la incidencia, severidad y efecto en la producción, se ha determinado que en Guatemala, las más importantes son: Raquitismo de las socas, Carbón, Escaldadura foliar, Roya marrón o café y Roya naranja. El segundo grupo en importancia está integrado por: Virus del mosaico de la caña de azúcar, Raya roja y Amarillamiento foliar y el tercer grupo por: Cogollo retorcido (Pokkah boeng), Mancha púrpura, Mancha amarilla y Raya clorótica (Ovalle, 2012). A continuación se hace una breve descripción de las enfermedades involucradas en el presente trabajo:

Escaldadura foliar: Es una enfermedad vascular causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans*, cuya presencia se restringe a los elementos del xilema en el tejido vascular. Produce una fitotoxina la cual se cree que inhibe el desarrollo de los cloroplastos e interrumpe la fotosíntesis. Tiene el potencial para limitar seriamente el cultivo de variedades susceptibles. Puede tener un período latente (asintomático) que dura años. Es además una enfermedad complicada por el hecho de que se puede manifestar en una fase crónica o aguda (Comstock y Gilbert, 1991). El síntoma típico de la fase crónica son las “líneas de lápiz”, unas líneas blancas de 1 a 2 mm de ancho en las hojas, que corren paralelo a las

nervaduras y que se extienden desde la nervadura central hacia los bordes. Además, en tallos maduros, la punta de las hojas se necrosa y aparecen brotes laterales de la base del tallo hacia arriba. Normalmente estos brotes presentan líneas de lápiz y mueren poco tiempo después (Comstock y Gilbert, 1991). Cuando se presenta la fase aguda, los tallos pueden marchitarse de súbito y cambiar del color normal a un rojo oscuro y morir repentinamente sin haber presentado otros síntomas. En Guatemala es una enfermedad importante, debido a que las condiciones ambientales de estrés (períodos lluviosos severos y períodos secos severos) favorecen su diseminación y expresión. Su transmisión se da principalmente por el uso de semilla vegetativa y herramientas contaminadas con la bacteria. Su control es a través del uso de variedades resistentes y mediante tratamiento hidrotérmico de la semilla vegetativa (Ovalle, 2012) aunque no es eficiente al 100 por ciento.

Raquitismo de las socas:

Esta enfermedad es causada por la bacteria identificada como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Es difícil de diagnosticar pues sus síntomas son poco claros y pueden confundirse con los producidos por estrés abiótico. Cuando las plantas están infectadas ocurre una reducción progresiva en la producción de caña a través de los cortes, cuyo efecto dio origen al nombre de la enfermedad. Esto ocurre como resultado de la obstrucción del xilema por la

bacteria. Además, las macollas o cepas enfermas pueden producir un menor número de tallos. Su transmisión ocurre por el uso de semilla y herramientas contaminadas (Ovalle, 2012). Se le considera como una de las enfermedades más importantes a nivel mundial. Muestra infecciones en todas las variedades cultivadas en Guatemala y es capaz de causar efectos importantes en la producción. El método de control más utilizado es el tratamiento térmico a los esquejes (Ovalle, 2012), aunque como en el caso anterior no es totalmente efectivo.

Virus del mosaico de la caña de azúcar: Conocida comúnmente como “mosaico”, presenta como síntoma más distintivo en la hoja, un patrón en mosaico de verdes (Figura 2). No es una enfermedad simple sino múltiple, que puede ser causada por cuatro diferentes virus patógenos: Mosaico de la caña, mosaico del sorgo, mosaico del enanismo del maíz y mosaico del pasto Johnson (Comstock y Gilbert, 1991), todos pertenecientes al género *Potyvirus*, de la familia Potyviridae (Goncalves *et al.* 2011). El virus se transmite en los esquejes de semilla y también a través de los áfidos *Rhopalosiphum maidis*, *Hysteroneura setariae* y *Toxoptera graminum*. El método de control recomendado es el uso de variedades resistentes (Ovalle, 2012).

Amarillamiento foliar: El síndrome de la hoja amarilla de la caña de azúcar (YLS) se reportó por primera vez en Hawaii en 1989 y desde entonces ha sido observado en más de 30 países. Los síntomas típicos de la enfermedad incluyen amarillamiento de la nervadura central (Figura 2), que aparece al inicio en la parte abaxial de las hoja y que eventualmente se extiende a la lámina, acortamiento de los entrenudos, amarillamiento y necrosis foliar. En un inicio se demostró que un Luteovirus, (el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV)) era el causante del YLS, pero posteriores estudios revelaron un fitoplasma asociado con la enfermedad. Recientemente se le ha denominado como “hoja amarilla” a la enfermedad causada por SCYLV y “amarillamiento foliar” a la enfermedad causada por el fitoplasma del amarillamiento foliar de la caña de azúcar (SCYP) (Joomun *et al.*, 2007). La transmisión de la enfermedad causada por el virus, es a través de los esquejes de semilla y por los áfidos *Melanaphis sacchari* y *Rhopalosiphum maidis*. La transmisión del fitoplasma se reporta a través del insecto *Saccharosydne saccharivora* comúnmente llamado “coludo”. Para su control se recomienda el uso de variedades resistentes (Ovalle, 2012).

Programa de mejora genética en Guatemala: En Guatemala, el Programa de Variedades de CENGICAÑA realiza el mejoramiento genético de la caña de azúcar enfocado a contribuir al incremento de la productividad de azúcar. Para ello se pretende generar y/o adaptar variedades de alto tonelaje de caña y rendimiento de azúcar, a las diferentes condiciones ambientales, y que a su vez muestren resistencia a las

enfermedades y las plagas más comunes. El programa de variedades de CENGICANA, inició sus actividades en el año de 1992 y fue establecido con una estrategia general que contempla tres componentes principales: a) variabilidad genética (germoplasma y cruzamientos), b) evaluación y selección y c) liberación de variedades nuevas. La estrategia conlleva cuatro objetivos de mejoramiento: a) mejoramiento del rendimiento de azúcar por unidad de área, b) resistencia a enfermedades, c) adaptabilidad y d) habilidad de soqueo. Estos objetivos de mejoramiento responden al prototipo varietal requerido por la agroindustria azucarera guatemalteca (Orozco *et al.* 2012). Todos estos objetivos requieren del manejo de un gran número de materiales, de metodologías apropiadas de selección y de metodologías que permitan comprobar el estado sanitario de las plantas en determinadas fases del proceso, es decir la ausencia de patógenos en los materiales que se van a utilizar. Puesto que la propagación de los materiales es vegetativa, y muchos de ellos son sensibles a patógenos que afectan a este cultivo, el desarrollo de protocolos que permitan el saneamiento de material infectado es una necesidad.

Técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas para la mejora de la caña de azúcar. Producción de plantas libres de patógenos, micropropagación y

conservación de germoplasma.

Las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas pueden utilizarse con fines muy diversos como son la producción de material vegetal libre de patógenos, la micropropagación, la conservación de germoplasma, la transformación genética, la selección de mutantes, la hibridación somática o el aprovechamiento de la variación somaclonal. En el caso de la caña de azúcar se ha trabajado con todas estas metodologías (Lakshmanan *et al.* 2005; Snyman *et al.* 2011), las cuales requieren en su mayoría de la regeneración de plantas a partir de explantes. Esa regeneración puede producirse en la caña de azúcar por la vía organogénica o a través de la embriogénesis somática. A su vez, cada una de estas vías puede ser, directa o indirecta. Heinz y Mee (1969) fueron los primeros en regenerar plantas de caña de azúcar a partir de callo. A continuación se comenta brevemente las técnicas relacionadas con este trabajo:

Producción de plantas libres de patógenos: El cultivo de meristemos es la técnica más utilizada para el saneamiento de plantas infectadas, se basa en el supuesto de que no todas las células de un meristemo apical están infectadas con el patógeno, pues no llegan los haces vasculares y que por lo tanto es posible disectar una región no infectada y regenerar una planta sana. El cultivo de discos foliares también se ha utilizado en la caña de azúcar con el fin de obtener plantas libres de enfermedades. En muchas ocasiones, estas técnicas se combinan con tratamientos térmicos, antivirales o crioterapia (Burbano y Garcés, 2007; Wang *et al.*, 2007). Son distintos los trabajos reportados en caña de azúcar:

- Leu (1978) obtuvo plantas sanas a partir de plantas que mostraban síntomas de Mosaico, Raquitismo, Hoja blanca, Mildiu y Mancha clorótica, a través del cultivo de meristemos apicales y rediferenciación de callo, en combinación con tratamiento hidrotérmico de la semilla vegetativa.
- Parmessur *et al.* (2002), indujeron la formación de callo en 30 variedades de caña de azúcar infectadas con el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar y/o con el Fitoplasma del amarillamiento de la caña de azúcar utilizando discos foliares como explantes para la producción de material sano.
- Otra aproximación fue la realizada por Snyman *et al.*, (2005) que evaluaron el sistema Novacane® de micropropagación rápida mediante embriogénesis somática directa, para la eliminación de patógenos en plantas infectadas con Raquitismo de las socas (RSD), Fitoplasma del amarillamiento de la caña de azúcar (SCYP), Virus del Amarillamiento de la caña de azúcar (SCYLV), Virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) y Escaldadura foliar (LSD).

- Ramgareeb *et al.*, (2010), utilizaron el cultivo de meristemos combinado con la termoterapia para regenerar plantas de caña de azúcar de la variedad NCo 376 libres del virus del Mosaico de la caña de azúcar y del virus de la Hoja amarilla de la caña de azúcar a partir de material infectado.
- Subba y Sreenivasulu (2011), regeneraron plantas libres del virus del Mosaico rayado de la caña de azúcar (SStMV) utilizando termoterapia y cultivo de meristemos.

La utilización de marcadores moleculares para confirmar la presencia de patógenos y su identificación antes de obtener los meristemos y/o confirmar la ausencia de éstos tras la regeneración es de gran interés, pues al utilizarse en combinación con las técnicas *in vitro* se puede asegurar la limpieza de los semilleros con los que se inician las siembras, además de fortalecer los procesos de cuarentena e intercambio de germoplasma con programas de mejora de otros países. En caña de azúcar se han utilizado distintos marcadores asociados a las enfermedades previamente comentadas (Smith y Van de Velde 1994; Davis, Rott y Astua-Monge 1998; Joomun *et al.*, 2007)

Micropropagación: La micropropagación es la propagación fiel de un genotipo y puede obtenerse por distintas vías (Gisbert *et*

al., 2008). En caña de azúcar son numerosos los protocolos de micropropagación descritos (Ahloowalia y Maretzki 1983; Chengalrayan *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2006; Gill *et al.*, 2006; Ho y Vasil, 1983;). Para ello se han utilizado explantes de hojas (Parmessur *et al.*, 2002; Snyman *et al.*, 2005;) y meristemos (Khan *et al.*, 2008; Ramgareeb *et al.*, 2010; Victoria y Calderón, 1995). En muchos de estos protocolos destaca la influencia del genotipo, los reguladores de crecimiento empleados, las condiciones de incubación y se comentan los problemas de los explantes con la oxidación (Azofeita, 2009; García *et al.*, 2007; Gallo-Meagher *et al.*, 2000; Shiromani *et al.*, 2010). Esto indica la necesidad de desarrollar protocolos de micropropagación que sean adecuados para cada variedad.

Las eficiencias obtenidas son distintas según los trabajos. Por ejemplo, en el reportado por Meyer *et al.* (2010) se obtiene 1600 plantas por meristemo en 5 meses, mientras que Victoria y Calderón (1995) reportan que con los resultados obtenidos se podrían obtener hasta 1600 plantas por meristemo en 3 meses. Por otra parte, Ramgareeb *et al.* (2010) obtuvieron 1300 brotes a partir de un meristemo en 11 semanas.

- Conservación de Germoplasma: Las técnicas de cultivo *in vitro* también permiten la conservación de germoplasma *in vitro* o criopreservado. En el primero de los casos, requiere de subcultivo periódico de los materiales pero se puede disponer de las plantas para aclimatarlas y llevarlas a campo cuando se necesiten. En el segundo, se necesita la regeneración de la planta antes de poder ser aclimatada, normalmente se pueden almacenar los materiales por un periodo muy largo de tiempo. Taylor y Dukic (1993) desarrollaron una metodología para la micropropagación y almacenamiento de más de 200 clones de híbridos de *Saccharum* spp. utilizando meristemos apicales como explante. Disponer de clones mantenidos *in vitro* y obtenidos a partir de plantas sanas facilita el intercambio de germoplasma entre instituciones y el suministro de materiales sanos a demanda.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación: En Guatemala, el proceso para desarrollar nuevas variedades de caña de azúcar se basa en el mejoramiento genético convencional. La mayor fuente de variabilidad genética se obtiene a través de cruzamientos entre variedades utilizadas como progenitores, que han sido seleccionadas en la colección nacional de la agroindustria azucarera. Otra fuente de variabilidad la constituye la introducción de variedades del extranjero, que se realiza por medio de convenios de intercambio de germoplasma. Sin embargo, para evitar el ingreso al país de nuevas formas de enfermedades ya existentes o de nuevas enfermedades que afectan al cultivo de caña de azúcar, el Área de Fitopatología de CENGICAÑA

implementó un proceso de cuarentena, en el cual, las variedades que muestren síntomas de alguna enfermedad son eliminadas. Sin embargo, el saneamiento de variedades mediante cultivo de tejidos puede evitar esta eliminación y la consecuente pérdida de recursos. Disponer de un proceso que permita obtener plantas libres de enfermedades es estratégicamente importante para el Programa de Variedades de CENGICAÑA pues facilita el ingreso de todos los materiales importados, evitando de esta manera, la eliminación de variedades en el proceso de cuarentena. Además, esta metodología puede utilizarse para obtener y certificar germoplasma local con buena calidad fitosanitaria para exportación. Otra ventaja que nos aportan las técnicas de cultivo *in vitro*, es que con la micropropagación a partir de las plantas sanas o materiales saneados podemos disponer de clones sanos que pueden introducirse para ser evaluados en el momento en que se requieran. La micropropagación y conservación de este germoplasma *in vitro* nos permite mantener un número elevado de clones en un espacio reducido y en condiciones controladas.

OBJETIVOS

Los objetivos que se plantean en este trabajo son:

1. Regenerar plantas libres de las enfermedades Amarillamiento foliar y virus del Mosaico de la caña de azúcar a partir de variedades introducidas en Guatemala desde distintas procedencias. Estas enfermedades fueron detectadas durante el proceso de cuarentena realizado en el Programa de Variedades de CENGICAÑA.
2. Regenerar plantas a partir de meristemos provenientes de variedades desarrolladas localmente, que puedan utilizarse con fines de exportación en los convenios de intercambio de germoplasma.
3. Comprobar y certificar mediante la utilización de marcadores moleculares la ausencia de los patógenos causantes del Amarillamiento foliar y del Virus del Mosaico de la caña de azúcar, así como de los causantes del Raquitismo de la soca y Escaldadura foliar, en las plantas regeneradas a partir de los meristemos. Estas dos últimas enfermedades se incluyen en la certificación porque están causando graves daños al cultivo.
4. Micropropagar y conservar las plantas saneadas mediante cultivo *in vitro* para su posterior aclimatación y uso en distintos programas de mejora y/o intercambio de germoplasma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se han llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA, ubicado en el municipio de Santa Lucía Cotzumalguapa, departamento de Escuintla, Guatemala.

Material vegetal

En total se han utilizado 23 variedades de caña de azúcar, 16 locales y 7 introducidas de diferentes orígenes.

Cuadro 2. Listado de las variedades locales utilizadas y sus principales características agronómicas en comparación con la variedad control

No.	Variedad	Progenitores	CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS				
		Femenino x Masculino	RENDIMIENTO AZUCAR	CONTENIDO SACAROSA	RENDIMIENTO CAÑA	Fibra (%)	Floración
1	CG96-01	CP72-1312 X CP57-603	Promedio	Alto	Promedio	13,1	Baja
2	CG96-52	Q96 X CP57-603	Promedio	Alto	Bajo	DND	Baja
3	CG96-78	CP65-357 X CP57-603	Alto	Promedio	Promedio	13,8	Baja
4	CG97-100	CB46-47 X CP57-603	Promedio	Promedio	Promedio	13,7	No
5	CG98-10	PR87-2078 X PR87-2073	Alto	Promedio	Alto	14,7	Baja
6	CG98-46	CP56-59 X CP57-603	Alto	Alto	Alto	12,7	Alta
7	CG98-62	Mex60-445 X CP57-603	Alto	Promedio	Alto	14,6	Baja
8	CG98-78	TUC68-19 X CP57-603	Alto	Promedio	Alto	DND	Alta
9	CGSP98-16	CTC 93981 X ?	Promedio	Promedio	Alto	14,2	Baja
10	CG00-033	CG95-125 X CP81-1384	Alto	Alto	Alto	13,8	Baja
11	CG00-044	MY 5464 X CP72-2086	Promedio	Bajo	Alto	13,8	No
12	CG00-092	PGM89-968 X CG96-64	Alto	Bajo	Alto	16,1	Baja
13	CG01-17	Mex74-1409 X CP81-1384	Alto	Promedio	Alto	14,5	Baja
14	CG01-87	JA64-19 X CP91-1384	Alto	Alto	Alto	14,3	Baja
15	CG02-007	CP87-1491 X CP81-1384	Alto	Promedio	Alto	15,8	Baja
16	CG02-144	CG96-01 X SP79-2233	Alto	Alto	Alto	12,9	Baja
17	CP72-2086 (Control)	CP62-374 X CP63-588	Promedio (11 T/ha)	Promedio (11 %)	Promedio (100 T/ha)	12,5	Alta

Características de los sitios experimentales en Guatemala: Lat 14 N, Long 90 W, 0-500 msnm, 26°C.

Variedades locales: Se han utilizado 16 variedades desarrolladas localmente por CENGICANA y 11 de ellas se consideran de alto rendimiento (Cuadro 2). Estos 16 materiales forman parte del germoplasma que se ofrece en los convenios de intercambio varietal con instituciones de contraparte en otros países. Los tallos de variedades locales fueron colectados de plantas fenotípicamente sanas ubicadas en parcelas del Banco de Semilla Genética localizadas en la Estación Experimental Camantulul, Santa Lucía Cotzumalguapa.

Variedades introducidas: Las siete variedades restantes (Cuadro 3) fueron seleccionadas por presentar síntomas visibles del Virus del Mosaico de la caña de azúcar o de Amarillamiento foliar (Figura 2) durante la evaluación realizada en el proceso de cuarentena que siguieron luego de ser introducidas a Guatemala en los años 2009 y 2010.

Cuadro 3. Listado de variedades introducidas y síntomas observados

No.	Grupo de Introducción	Planta No.	Procedencia	Variedad	Síntomas visibles
1	46	7	México	Mex80-1428	Mosaico
2	46	10	México	MotzMex95-401	Mosaico
3	50	3	Tailandia	MTP99-1444	Mosaico
4	45	5	EUA	HoCP05-920	Amarillamiento
5	51	6	EUA	Ho07-613	Amarillamiento
6	44	1	EUA	CPCL06-3298	Amarillamiento
7	44	27	EUA	CP07-2629	Amarillamiento

Limpieza de materiales y brotación:

En todas las variedades, el procedimiento de limpieza consistió en cortar los tallos dejando las porciones de los nudos con una longitud de 5 cm aproximadamente. Estos segmentos, cada uno con una yema, fueron tratados en un baño con agua a 51°C durante una hora, con el objetivo de

de enfermedades (Figura 3).

Luego fueron colocados en bandejas plásticas con papel absorbente humedecido, a temperatura ambiente y oscuridad durante 10 días, para favorecer la brotación de las yemas (Figura 4).

Los brotes obtenidos se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 2 por ciento v/v durante 20 minutos y luego se lavaron tres veces con agua esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar.

eliminar bacterias causantes

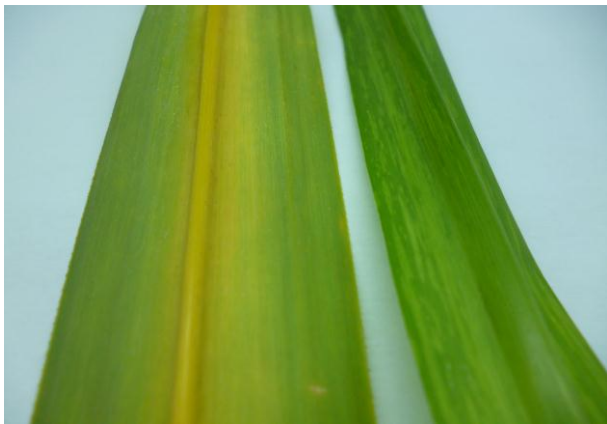


Figura 2. Síntomas que muestran la presencia de Amarillamiento foliar (izquierda) y Virus del Mosaico de la caña (derecha).



Figura 3. Tratamiento hidrotérmico de las yemas a 51°C



Figura 4. Brotación de yemas para la obtención de meristemos

Cultivo de meristemos

Se extrajeron los meristemos apicales con un diámetro aproximado de 0.2 – 0.5 mm a partir de los brotes desinfectados (Figura 5) y se inocularon en un medio que contenía las sales de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 g/l de sacarosa, 0.15 mg/l de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 0.8 por ciento de agar. Los meristemos se incubaron a 25°C durante ocho días bajo condiciones de oscuridad con el objetivo de disminuir el daño causado por oxidación y posteriormente se trasladaron a condiciones de luz con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y la misma temperatura (25°C).

Micropropagación

Se utilizaron 10 variedades locales para iniciar la micropropagación: CG96-78, CG98-78, CG98-46, CG97-100, CG02-007, CG00-044, CG00-092, CG96-01, CG98-62 y CG00-033. Cada planta regenerada de un meristemo fue identificada y utilizada para iniciar la multiplicación en un medio líquido (sin agar) que contenía los mismos componentes arriba descritos, con excepción de que la concentración de BAP aumentó a 0.30 mg/l. Transcurrido un mes desde el inicio de la micropropagación se anotaron los datos de No. de brotes/explante inicial.

Efecto del ácido indolbutírico (AIB) en el

enraizamiento de variedades guatemaltecas de caña de azúcar micropropagadas *in vitro*: En todas las variedades micropropagadas (listadas en el apartado anterior), se evaluaron cuatro concentraciones de AIB (0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/l) para estudiar el posible efecto de estímulo de la formación de raíces.

El diseño del experimento fue bifactorial 10 x 4 con diferente número de repeticiones para cada tratamiento (entre 3 y 29). La unidad experimental fue un frasco de cultivo y las variables registradas fueron:

1. Porcentaje de plantas enraizadas
2. Número medio de raíces por planta
3. Longitud media de raíz (mm)

3.5 Extracción de ácidos nucleicos y análisis moleculares

Se muestreó un frasco de cada clon y a las plantas se les extrajo ADN y ARN para realizar el diagnóstico de los patógenos, utilizando tejido foliar.

Para la extracción de ADN se siguió el método descrito por Parmessur *et al.* (2002), mientras que para la extracción de ARN se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN extraído se midió utilizando espectrofotometría de absorción y todas las muestras fueron diluidas a una concentración de 50 ng/ μ L.



Figura 5. Detalle del meristemo apical utilizado como explante (Aumento 15X)

Diagnóstico de enfermedades

El diagnóstico de Raquitismo de las socas y Escaldadura foliar se realizó simultáneamente en una misma reacción, de acuerdo con el procedimiento descrito por Davis, Rott y Astua-Monge (1998), con la diferencia de que el ADN no fue extraído de jugo de caña sino de tejido foliar. El diagnóstico de Fitoplasma del Amarillamiento de la caña de

azúcar se realizó según el procedimiento descrito por Joomun *et al.*, (2007) y el diagnóstico del virus del Mosaico de la caña de azúcar se realizó de acuerdo a lo reportado por Smith y Van de Velde (1994), mediante el análisis de ARN con PCR de transcripción inversa (RT-PCR), con la excepción de que no se diagnosticó simultáneamente el virus de Fiji (FDV). Para esto se utilizó el kit One-Step RT-PCR Master Mix (Novagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los iniciadores, las condiciones de PCR y la longitud de los productos amplificados se resumen en los Cuadros 4 y 5.

Por último, los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al uno por ciento y teñidos con bromuro de etidio, para ser visualizados con luz ultravioleta.

Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para realizar los diagnósticos y tamaño del producto amplificado.

Diagnostico	Secuencias de Iniciadores		Tamaño del Producto Amplificado
	PCR 1	PCR 2	
RSD	5'- CTG GCA CCC TGT GTT GTT TTC - 3'	5'- TCA ACG CAG AGA TTG TCC AG -3'	229 bp
	5'- TTC GGT TCT CAT CTC AGC GTC - 3'	5'- CGT CTT GAA GAC ACA GCG ATG AG -3'	
LSD	5' CAC ACA CAC AAT ACA GCA TTG CGG 3'	5'- CTT CTG CAG CTT GCT CGT C -3'	308 bp
	5'- CCC AAC TTA CTT GAG GCT ATG G - 3'	5'- GCT CAG TTA CGC TCA GCT AAT C -3'	
SCYP	5'- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T - 3'	5'- ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG -3'	1250 bp
	5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT - 3'	5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G -3'	
SCMV	5'- ACA CAA GAG CAA CCA GAG AGG -3'		359 bp
	5'- AGT CAA AGG CAT ACC GCG CTA -3'		

RSD = Raquitismo de las socas, LSD = Escaldadura foliar, SCYP = Fitoplasma del amarillamiento de la caña de azúcar, SCMV = Virus del mosaico de la caña de azúcar

Cuadro 5. Volúmenes y condiciones de reacción para el diagnóstico de las enfermedades

Diagnostico	Volúmenes de reaccion				Condiciones de reacción*		
RSD + LSD	PCR 1		PCR 2		Condiciones de reacción*		
	Agua desmineralizac	6.9µL	Agua desmineralizada	6.9µL	94°C	4 min	1 ciclo
	Bufer	2.5µL	Bufer	2.5µL	94°C	30 seg	31 ciclos
	dNTPs	0.5µL	dNTPs	0.5µL	55°C	30 seg	
	Iniciador 1 (F)	2.5µL	Iniciador 3 (F)	2.5µL	65°C	1 min	
	Iniciador 1 (R)	2.5µL	Iniciador 3 (R)	2.5µL	65°C	3 min	1 ciclo
	Iniciador 2 (F)	2.5µL	Iniciador 4 (F)	2.5µL	4°C	HOLD	
	Iniciador 2 (R)	2.5µL	Iniciador 4 (R)	2.5µL			
	Taq Polimerasa	0.1µL	Taq Polimerasa	0.1µL			
	ADN	5µL	Producto de PCR 1	5µL			
	Volumen total	25 µL	Volumen total	25 µL			
	PCR 1		PCR 2		Condiciones de reacción**		
SCYP	Agua desmineralizac	12.9µL	Agua desmineralizada	12.9µL	94°C	3 min	1 ciclo
	Bufer	2.5µL	Bufer	2.5µL	94°C	30 seg	35 ciclos
	dNTPs	0.5µL	dNTPs	0.5µL	55°C	90 seg	
	Iniciador 1 (F)	2.0µL	Iniciador 2 (F)	2.0µL	72°C	90 seg	
	Iniciador 1 (R)	2.0µL	Iniciador 2 (R)	2.0µL	72°C	10 min	1 ciclo
	Taq Polimerasa	0.1µL	Taq Polimerasa	0.1µL	4°C	HOLD	
	ADN	5µL	Producto de PCR 1	5µL			
		Volumen total	25 µL	Volumen total	25 µL		
SCMV	RT-PCR				Condiciones de RT-PCR		
	2x One Step RT-PCR	25µL			90°C	30 seg	1 ciclo
	Mn(Oac)2 50 mM	2.5µL			60°C	30 min	1 ciclo
	Iniciador 1 (F)	2µL			94°C	1 min	1 ciclo
	Iniciador 1 (R)	2µL			94°C	30 seg	40 ciclo
	Agua libre de ARNas	13.5µL			60°C	30 seg	
	ARN	5µL			72°C	1 min	
		Volumen total	50 µL			60°C	7 min
				4°C	HOLD		

RSD = Raquitismo de las socas, LSD = Escaldadura foliar, SCYP = Fitoplasma del amarillamiento de la caña de azúcar
 SCMV = Virus del mosaico de la caña de azúcar. El bufer en todos los casos con una concentración inicial 10X, los dNTPs a una concentración inicial de 10mM y todos los iniciadores a una concentración inicial de 10 µM

*Tanto para PCR1 como para PCR2. **En la PCR2 la temperatura de anillamiento cambia de 55 a 56°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de materiales y cultivo de meristemos

La desinfección de las 23 variedades de caña utilizadas, 16 locales y 7 introducidas desde México, Estados Unidos

y Tailandia, no presentó problemas, en el sentido de que se consiguió brotar yemas de todas ellas, sin contaminación aparente, a pesar de utilizar un número muy limitado de explantes en algunas de las variedades. A partir de los meristemos obtenidos se ha podido regenerar al menos una planta de las 23 variedades (Cuadro 6). Es por eso que el medio de cultivo y las condiciones de incubación utilizadas se consideran adecuados para este proceso. Este medio de cultivo es similar al descrito por Ramgareeb *et al.* (2010), pero difiere en que no contiene el regulador de crecimiento kinetina, que se utilizaba en este trabajo, en muy baja concentración.

En conjunto, de los 146 meristemos sembrados, el 30.82 por ciento continuó su desarrollo hasta la formación de planta, en un período de entre 2-4 meses. Estos resultados concuerdan con los reportados por Leu (1978), quien reporta entre 30-60 por ciento en la formación de plantas a partir de meristemos apicales en un período de 2-5 y hasta 7 meses y Parmessur *et al.*, (2002) quienes reportan 35.0 por ciento de regeneración. Por otro lado, difieren con lo reportado por Ramgareeb *et al.*, (2010) quienes determinaron que el 100 por ciento de los meristemos sembrados produjo plantas. En nuestro estudio, en algunos meristemos se desarrolló una única planta pero, en general a partir del meristemo sembrado se obtuvo la regeneración de nuevos brotes (Figura 6), También se ha publicado esto en el trabajo de Leu (1978).

El Cuadro 6 muestra los resultados obtenidos en la regeneración a los 4 meses de haber introducido los meristemos en el medio de

cultivo. Como puede observarse en este cuadro, una de las posibles causas de obtener una regeneración inferior al 50 por ciento puede ser la oxidación observada en los meristemos cultivados, que se observó en un 32.9 por ciento de los meristemos. La contaminación también ha impedido el desarrollo de los meristemos en un 36.3 por ciento de los explantes. Sin embargo, en los meristemos en los que se ha desarrollado planta, se ha podido observar un crecimiento óptimo en todas las variedades como el mostrado en la Figura 6. Esto nos ha permitido utilizar éstas plantas regeneradas, como explantes para la posterior micropropagación

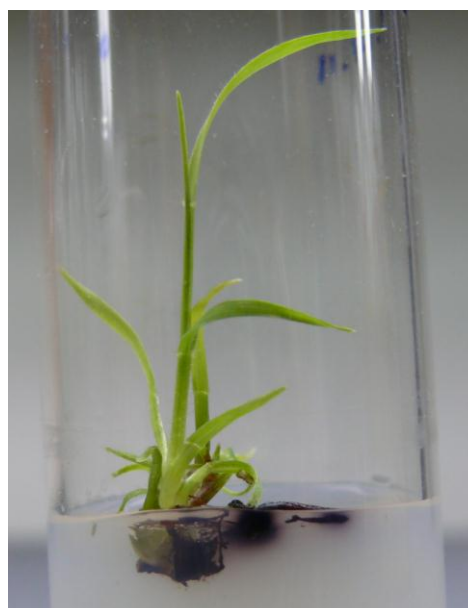


Figura 6. Planta regenerada a partir de un meristemo apical.

Cuadro 6. Número de meristemos sembrados de cada variedad y su respuesta a la regeneración de plantas.

No.	Variedad	Meristemos			
		Sembrados	Con planta	Oxidados	Contaminados
1	CG00-044	2	1	1	0
2	CG96-78	4	1	3	0
3	CG00-033	6	3	2	1
4	CG00-092	2	2	0	0
5	CG97-100	1	1	0	0
6	CG96-01	5	3	1	1
7	CG96-52	7	1	6	0
8	CG98-10	7	3	2	2
9	CGSP98-16	16	1	0	15
10	CG98-46	4	1	1	2
11	CG98-62	11	3	7	1
12	CG98-78	10	2	5	3
13	CG01-87	8	3	4	1
14	CG01-17	7	4	0	3
15	CG02-144	5	3	0	2
16	CG02-007	11	4	3	4
17	46-7 (Mex80-1428)	6	2	1	3
18	46-10 (Motz/Mex95-401)	2	2	0	0
19	50-3 (MTP99-1444)	2	1	1	0
20	45-5 (HoCP05-920)	6	1	2	3
21	51-6 (Ho07-613)	12	1	4	7
22	44-1 (CPCL06-3298)	7	1	4	2
23	44-27 (CP07-2629)	5	1	1	3
	Totales	146	45	48	53

Multiplicación clonal

Para inducir nuevos brotes se utilizó como material de partida los brotes inducidos a partir de cada uno de los meristemas de 10 variedades. El cultivo en medio MS líquido con 0.30 mg de BAP por litro produjo la inducción de nuevos brotes en todas las variedades (Cuadro 7, Figura 7). El número de plantas obtenidas por cada meristemo en su primera fase de propagación mostró variabilidad entre los genotipos (Cuadro 7) en un rango de 20.5 ± 2.4 para la variedad CG00-033 y 60.8 ± 2.7 para la variedad CG96-01, con un número promedio (para el conjunto de variedades) de 44.15 plantas al mes del inicio de la micropropagación. La regeneración es directa, es decir, sin formación de callo. Este hecho es importante puesto que la presencia de callo puede favorecer la aparición de variantes somaclonales. La

ausencia de callo y la alta tasa de multiplicación obtenida indican la consecución de un sistema adecuado para llevar a cabo la micropropagación de estos materiales a gran escala puesto que, las plantas obtenidas pueden utilizarse como madres para su posterior multiplicación. El regulador BAP se ha utilizado solo o en combinación con otros reguladores para la micropropagación de variedades de caña de azúcar. Victoria y Calderón (1995) utilizaron MS suplementado con 0.2 mg/l de BAP. Por otro lado, Franklin *et al.* (2006); y Ramgareeb *et al.* (2010), lo utilizaron combinado, con ácido giberélico (GA_3) y kinetina, respectivamente. Estos últimos obtuvieron 1300 plantas micropropagadas de la variedad NCo376 tras 11 semanas de cultivo en medio MS con 0.1 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de kinetina. En nuestro caso y tomando como referencia el número medio se podrían obtener desde el inicio de la micropropagación 1936 plantas en dos meses.



Figura 7. Multiplicación de brotes en una planta regenerada a partir de meristemo apical

Cuadro 7. Número medio de plantas producidas por meristemo en la primera fase de propagación, a los 30 días de la siembra

Variedad	No. de plantas/meristemo
CG96-78	55.6 ± 3.5
CG98-78	40.8 ± 4.2
CG98-46	30.4 ± 2.6
CG97-100	52.7 ± 4.6
CG02-007	27.5 ± 4.1
CG00-044	55.8 ± 7.8
CG00-092	55.6 ± 5.4
CG96-01	60.8 ± 2.7
CG98-62	41.9 ± 7.1
CG00-033	20.5 ± 2.4

Efecto del ácido indolbutírico (IBA) en el enraizamiento de plantas de caña de azúcar micropropagadas *in vitro*:

Tras la multiplicación, es conveniente ajustar las condiciones de enraizamiento para que éste no sea un factor limitante en la posterior aclimatación de las plantas. Puesto que el ácido indolbutírico es uno de los reguladores de crecimiento utilizado con frecuencia para inducir el enraizamiento, se estudiaron cuatro concentraciones de este regulador con el fin de seleccionar la más adecuada. Algunos autores como Victoria y Calderón (1995) también reportan el uso del ácido naftalenacético para la inducción de raíces *in vitro*.

En medio base sin adicionar el regulador de crecimiento AIB, se puede observar variabilidad en cuanto a la capacidad de enraizamiento entre genotipos, a los 30 días de iniciada esta fase. Dentro de este nivel de AIB (0 mg/l), el porcentaje de plantas con raíz

estuvo en un rango entre 1.2 ± 1.2 para la variedad CG00-044 y 82.2 ± 9.7 para la variedad CG00-033. Este dato indica la necesidad de aumentar el porcentaje de plantas enraizadas en algunos genotipos. En cuanto al resto de parámetros medidos también se observa variabilidad. El número promedio de raíces/planta está en el rango 1.0 ± 0.0 en la variedad CG96-78 y 4.8 ± 0.5 en la variedad CG02-007 y la longitud media de raíces entre 1.8 ± 0.5 mm y 22.4 ± 0.8 mm para las variedades CG96-78 y CG00-033, respectivamente.

La adición de AIB (0.5-1.5 mg/l) incrementó el porcentaje de enraizamiento en los genotipos CG98-78, CG98-46 y CG97-100, mientras que en los demás no parece tener efecto, o no lo hemos podido observar debido al pequeño tamaño muestral en algunos tratamientos (Cuadro 8). El número promedio de raíces/planta también resultó favorecido por la utilización de AIB en el medio de cultivo en medio con las concentraciones más altas de AIB (1 ó 1.5 mg/l) en CG96-78, CG98-78, CG98-46 y CG97-100. Por último, la longitud media/raíz ha aumentado en algunos genotipos al adicionar AIB como es el caso del genotipo CG96-78 (0.5 ó 1 mg/l), los genotipos CG98-62 y CG02-007 (0.5 mg/l) y del genotipo CG96-01 (1mg/l). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Khan *et al.* (2008) quienes también encontraron una respuesta diferencial de los genotipos con relación a diferentes concentraciones de AIB y de ácido naftalenacético (ANA) para el enraizamiento *in vitro* de brotes de caña de azúcar.

Estos resultados nos indican que esta fase tendría que optimizarse para aquellos genotipos en los que el porcentaje de planta enraizada es bajo (< 50 %) y la adición de AIB no ha aumentado considerablemente este porcentaje, en concreto, los genotipos CG96-78, CG97-100, CG00-044, CG00-092 y CG96-01.

Cuadro 8. Resultados obtenidos en el enraizamiento *in vitro* de 10 variedades guatemaltecas de caña de azúcar en medio de cultivo con 4 concentraciones de ácido indolbutírico (AIB)

Tratamiento No.	Variedad	Concentración de AIB (mg/l)	Plantas enraizadas (%)	No. de raíces promedio/planta	Longitud media/raíz (mm)
1	CG96-78	0.0	6.7 ± 5.1	1.0 ± 0.0	1.8 ± 0.5
2		0.5	8.8 ± 8.8	1.7 ± 0.3	12.4 ± 1.8
3		1.0	13.7 ± 6.1	2.2 ± 0.3	12.8 ± 0.9
4		1.5	3.2 ± 1.6	1.9 ± 0.4	8.3 ± 1.0
5	CG98-78	0.0	11.7 ± 3.0	1.3 ± 0.1	11.4 ± 1.1
6		0.5	27.8 ± 15.4	1.6 ± 0.1	13.0 ± 1.3
7		1.0	30.4 ± 4.9	2.3 ± 0.3	11.7 ± 0.6
8		1.5	50.0 ± 13.2	3.0 ± 0.2	16.1 ± 0.6
9	CG98-46	0.0	2.8 ± 2.8	1.5 ± 0.5	12.3 ± 1.4
10		0.5	19.3 ± 7.1	1.6 ± 0.3	10.9 ± 1.2
11		1.0	55.8 ± 4.2	2.7 ± 0.4	11.7 ± 0.6
12		1.5	34.5 ± 22.7	3.2 ± 0.4	10.3 ± 0.9
13	CG97-100	0.0	4.6 ± 3.9	1.3 ± 0.3	12.9 ± 2.4
14		0.5	26.0 ± 11.0	1.9 ± 0.2	12.2 ± 1.2
15		1.0	22.9 ± 3.7	1.8 ± 0.2	7.8 ± 0.6
16		1.5	20.4 ± 14.6	3.4 ± 0.4	13.9 ± 0.6
17	CG02-007	0.0	69.3 ± 7.4	4.8 ± 0.5	9.6 ± 0.3
18		0.5	80.9 ± 10.0	4.6 ± 0.6	14.6 ± 0.5
19		1.0	70.3 ± 8.7	4.1 ± 0.3	8.8 ± 0.3
20		1.5	71.5 ± 11.3	4.8 ± 0.4	10.2 ± 0.4
21	CG00-044	0.0	1.2 ± 1.2	1.5 ± 0.5	9.0 ± 0.6
22		0.5	12.1 ± 5.5	1.7 ± 0.2	8.4 ± 0.8
23		1.0	5.3 ± 3.9	2.0 ± 0.6	7.0 ± 1.7
24		1.5	4.0 ± 3.0	1.8 ± 0.5	6.4 ± 1.3
25	CG00-092	0.0	16.3 ± 5.4	1.4 ± 0.1	8.4 ± 0.8
26		0.5	22.1 ± 5.6	1.8 ± 0.1	7.8 ± 0.7
27		1.0	15.3 ± 5.6	2.0 ± 0.2	5.5 ± 0.3
28		1.5	20.3 ± 5.5	2.2 ± 0.2	6.4 ± 0.3
29	CG96-01	0.0	7.4 ± 1.5	1.5 ± 0.1	7.2 ± 1.0
30		0.5	13.7 ± 10.5	1.9 ± 0.2	7.6 ± 0.5
31		1.0	13.9 ± 5.6	1.5 ± 0.1	9.5 ± 0.8
32		1.5	21.1 ± 9.3	1.6 ± 0.1	14.2 ± 0.9
33	CG98-62	0.0	54.6 ± 14.6	3.7 ± 0.4	15.3 ± 0.7
34		0.5	15.0 ± 15.0	4.7 ± 1.2	27.3 ± 2.5
35		1.0	59.9 ± 3.5	4.9 ± 0.5	8.1 ± 0.3
36		1.5	69.8 ± 10.9	4.8 ± 0.5	8.8 ± 0.3
37	CG00-033	0.0	82.2 ± 9.7	4.7 ± 0.5	22.4 ± 0.8
38		0.5	85.4 ± 8.1	5.8 ± 0.5	20.4 ± 0.5
39		1.0	73.4 ± 3.5	4.9 ± 0.5	21.6 ± 0.7
40		1.5	96.9 ± 3.1	7.6 ± 0.8	16.1 ± 0.4

Diagnóstico de enfermedades

El análisis de un clon de cada variedad regenerada a partir de meristemos se llevó a cabo con los distintos marcadores asociados a los patógenos causantes de las enfermedades conocidas como Fitoplasma del Amarillamiento foliar, Virus del Mosaico de la caña de azúcar, Raquitismo de las socas y Escaldadura foliar. En ninguna de las plantas analizadas en el presente trabajo, se amplificaron los marcadores moleculares asociados a las enfermedades anteriormente mencionadas. Esto indica que las plantas regeneradas a partir de los meristemos no contienen los patógenos mencionados. El cultivo de meristemos de caña de azúcar para la obtención de plantas sanas a partir de plantas infectadas con diversos patógenos, también ha resultado eficiente según los resultados publicados por Ramgareeb *et al.*, (2010), Parmessur *et al.*, (2002) y Leu (1978). No así, con los reportes de Chatenet *et al.* (2001); Snyman *et al.*, (2005) y Subba y Sreenivasulu (2011) quienes encontraron porcentajes variables de plantas en los que no se logró la eliminación de los patógenos.

Otros factores que probablemente hayan contribuido positivamente a lograr un 100 por ciento de plantas libres de patógenos son: el haber aplicado un tratamiento hidrotérmico a la semilla vegetativa, previo cultivo de meristemos, así

como la utilización de meristemos de pequeño tamaño (0.2-0.5 mm). Estos dos factores también se han reportado como claves en otros trabajos (Leu, 1978 y Ramgareeb *et al.*, 2010).

Una muestra de los resultados obtenidos en la caracterización para cada marcador asociado a los patógenos diagnosticados se puede ver en las siguientes Figuras (8-10).

La Figura 8 muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa para el análisis del fitoplasma del amarillamiento en siete variedades introducidas y tres locales. Puede observarse en el control positivo la banda esperada de 1250 pares de bases indicativa de la presencia del fitoplasma causante de la enfermedad, mientras que no se observa en ninguna de las variedades analizadas ni en el control negativo (sin ADN).

La Figura 9 muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa para el diagnóstico del Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar en tres variedades locales y tres introducidas. Igual que en el caso anterior, se observa en el control positivo, la banda indicativa de la presencia del patógeno, en este caso de 359 pares de bases y su ausencia en las variedades analizadas.

La Figura 10 muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa para el diagnóstico de Raquitismo de las Socas y Escaldadura Foliar en cuatro variedades locales. Se observan las bandas esperadas en los controles positivos, 229 bp para RSD, 308 bp para LSD y la ausencia de estas bandas en las variedades analizadas.

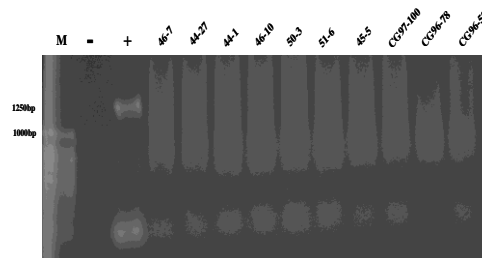


Figura 8. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa para el diagnóstico del Fitoplasma del Amarillamiento en 10 variedades de caña de azúcar. M = marcador de peso molecular, - = Control Negativo, + = Control Positivo

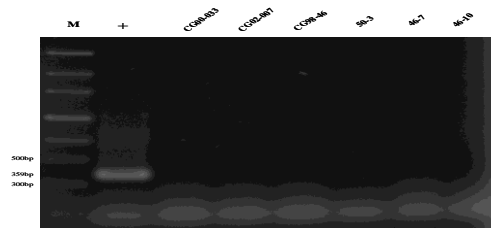


Figura 9. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa para el diagnóstico del Virus del Mosaico de la caña de azúcar en seis variedades de caña de azúcar. M = marcador de peso molecular, + = Control Positivo

Con estos resultados podemos concluir que la técnica de cultivo de meristemos previo tratamiento hidrotérmico de la semilla vegetativa, es muy eficiente para obtener plantas libres de los patógenos causantes de Amarillamiento foliar, Virus del Mosaico de la caña de azúcar, Raquitismo de las socas y Escaldadura foliar. Los marcadores moleculares nos han permitido certificar la ausencia de éstas enfermedades en las plantas regeneradas.

Utilización de los materiales obtenidos

Variedades locales: Las 16 variedades locales regeneradas y diagnosticadas en el presente trabajo, fueron enviadas (en tubos con medio

de cultivo) a la West Indies Sugar Cane Central Breeding Station (WISCCBS) en Barbados, como parte del intercambio de germoplasma realizado con CENGICAÑA (Figura 11).

- El envío de las variedades cultivadas *in vitro* fue la opción solicitada por la institución en Barbados con el objetivo de facilitar su ingreso al país y disminuir el riesgo de introducción de enfermedades.

Variedades introducidas:

Los clones obtenidos de las siete variedades introducidas desde México (Mex80-1428; MotzMex95-401), Estados Unidos (HoCP05-920; Ho07-613; CPCL06-3298; CP07-2629) y Tailandia (MTP99-1444) se han aclimatado y

cultivado en invernadero. No se ha observado ninguna sintomatología relacionada con las enfermedades mencionadas a los dos meses del trasplante (Figura 12). Este resultado, junto con los análisis moleculares realizados nos indican que estas plantas están libres de los patógenos causantes del Amarillamiento foliar, Escaldadura foliar, Raquitismo de las socas y del Mosaico de la caña de azúcar.

Estas variedades se sembrarán en campo en la fase denominada “Cuarentena Incremento” con el propósito de determinar su porcentaje de floración, y seleccionar las mejores variedades en base a sus características agronómicas. Se confirmará su estado fitosanitario en estadio adulto.

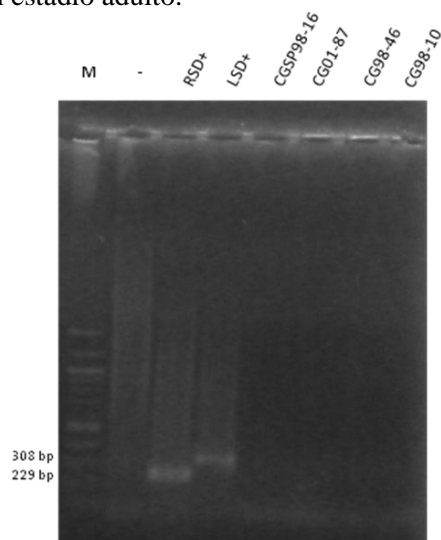


Figura 10. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa para el diagnóstico de Raquitismo de las Socas y Escaldadura foliar en cuatro variedades de caña de azúcar. M= Marcador de peso molecular, - = control negativo, RSD+ = control positivo para RSD, LSD+ = control positivo para LSD.



Figura 11. Plantas de variedades locales regeneradas por cultivo de meristemos y listas para su exportación



Figura 12. Plantas provenientes de cultivo de meristemos aclimatándose en invernadero

CONCLUSIONES

Se ha conseguido desinfectar esquejes de 23 variedades de caña de azúcar, 16 locales (guatemaltecas) y 7 introducidas (de diferentes orígenes) y así disponer de materiales para la brotación y obtención de meristemos que nos han permitido regenerar al menos una planta de cada una de las variedades.

Utilizando el cultivo de meristemos se han obtenido plantas libres de Fitoplasma del Amarillamiento y del Virus del Mosaico de la caña de azúcar en 7 variedades introducidas en Guatemala desde distintos países. El saneamiento de los materiales se ha comprobado utilizando marcadores moleculares asociados a las enfermedades comentadas. También se han utilizado marcadores para descartar la posible presencia de los patógenos causantes del Raquitismo de la soca y la Escaldadura foliar.

Se han regenerado plantas de 16 variedades locales a partir de cultivo de meristemos de plantas aparentemente sanas. Al igual que en los materiales introducidos, se ha descartado en las plantas regeneradas la posible presencia de los cuatro patógenos anteriormente comentados. En el caso de necesitar sanear materiales procedentes de campo de alguna de estas variedades, se podrá emplear la metodología desarrollada.

Se ha obtenido una elevada tasa de multiplicación a partir de brotes procedentes de meristemos en 10 variedades de caña de azúcar. En promedio, se pueden obtener cerca de 2000 plantas, transcurridos dos meses del inicio de la micropropagación. Esta metodología puede utilizarse para la micropropagación masiva de estas variedades. También se ha estudiado el efecto de adicionar AIB para inducir la formación de raíces de las plantas micropropagadas.

Los materiales introducidos y saneados en este trabajo se han transferido a campo para iniciar su evaluación agronómica y verificar su estado fitosanitario en estadio adulto. Las variedades locales obtenidas a partir de los meristemos y multiplicadas *in vitro* se han enviado a la Estación de Mejoramiento de Barbados como germoplasma certificado dentro del convenio de intercambio de variedades que se tiene con CENGICAÑA.

BIBLIOGRAFÍA

Ahloowalia B., Maretzki A. (1983). Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Reports* , 2: 21-25.

ASAZGUA. Asociación de Azucareros de Guatemala. (Sin fecha). Economía. www.azucar.com.gt. Consultado Enero 2012

- Azofeita A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Burbano C., Garcés F. (2007). Control del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV) mediante técnicas de cultivo de tejidos en la variedad CR74-250. *Revista Tecnológica ESPOL*, 20(1): 203-208.
- CENGICAÑA. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. (2011) Boletín estadístico. Año 12, No. 1.
- Chatenet M., Delage C., Ripolles M. (2001). Detection of Sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease*, 85: 1177-1180.
- Chengalrayan K., Abouzid A., Gallo-Meagher M. (2005). *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. *In Vitro Cellular Development and Biology of Plants*. 41: 477-482.
- Comstock J.C., Gilbert R.A. (1991). Diseases in sugarcane. University of Florida. SS-AGR-201-2. En http://edis.ifas.ufl.edu/topic_book_sugarcane_handbook
- Da Silva J., Bressiani J. (2005). Sucrose synthase molecular marker associated with sugar content in elite sugarcane progeny. *Genetics and Molecular Biology* 28(2): 294-298.
- Daniels J., Roach B.T. (1987). *Taxonomy and Evolution*. Chapter 2. In: D.J. Heinz, (ed). *Sugarcane Improvement Through Breeding*, Volume 11. Elsevier Amsterdam, pp. 7-84.
- Davis M.J., Rott P., Astua-Monge G. (1998). Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. *International Congress of Plant Pathology*, Edinburgh August 9-16. Paper 3.3.4.
- D'Hont A., Glaszmann C. (2001). Sugarcane genome analysis with molecular markers: A first decade of research. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. 24: 556-559.
- D'Hont A., Grivet L., Feldman P., Rao S., Berding N., Glaszmann J-C. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* 250: 405-413.
- Dillon S.L., Shapter F.M., Henry R.J., Cordeiro G., Izquierdo L., Lee S. (2007). Domestication to crop improvement: Genetic Resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogoneae). *Annals of Botany* 100: 975-989.
- FAOSTAT, 2010. Statistical Database. <http://faostat.fao.org>. Consultado Enero 2012.
- 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: 111-119.
- Gallo-Meagher M., English R., & Abouzid A. (2000). Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cellular Development and Biology of Plants*, 36: 37-40.
- García R., Cidade D., Castellar A., Lips A., Magioli C., Callado C. (2007). *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 90: 181-190.
- Gill R., Malhotra P., Gosal S. (2006). Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84: 227-231.
- Gisbert C., Fita A.M., Díez M.J. (2008). Prácticas de cultivo *in vitro* y transformación genética de plantas. Servicio de publicaciones de la UPV.
- Goncalves M.C., Galdeano D.M., Maia I.G., Chagas C.M. (2011). Variabilidade genética de *sugarcane mosaic virus* causando mosaico em milho no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* Brasília 46(4): 362-369.

- Heinz D.J. (1987). Introduction. In: DJ Heinz, (ed). *Sugarcane Improvement Through Breeding*, Volume 11. Elsevier Amsterdam, pp. 1-5.
- Heinz D., Mee J. (1969). Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Science*, 9: 346-348.
- Ho W.-J., Vasil I. (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, 118: 169-180.
- Hogarth D.M., Berding N. (2005). Breeding for a better industry: Conventional breeding. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, 25: 472-476.
- Jannoo N., Grivet L., Seguin M., Paulet F., Domaingue R., Rao P.S., Dookun A., D'Hont A., Glaszmann J.C. (1999). Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 171-184.
- Joomun N., Dookum-Saumtally A., Saumtally S., Ganeshan S. (2007). Sugarcane leaf yellows phytoplasma in Mauritius: Molecular characterisation, transmission and alternative hosts. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. 26: 1005-1013.
- Khan S.A., Rashid H., Chaudhary M.F., Chaudhry Z., Afroz A. (2008). Rapid micropropagation of three elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*. 7(13): 2174-2180.
- Lakshmanan P., Geijskes R., Aitken K., Grof C., Bonnett G., Smith G. (2005). Sugarcane Biotechnology: The challenges and opportunities. *In vitro Cellular Development and Biology of Plants*. 41: 345-363
- Leu, L. (1978). Apical meristem culture and redifferentiation of callus masses to free sugarcane systemic diseases. *Plant Protection Bulletin* , 20: 77-82.
- Lu D.H., D'Hont A., Paulet F., Grivet L., Arnaud M., Glaszmann J.C. (1994). Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. *Euphytica* 78: 217-226.
- Meyer G.M., Banasiak M., Keeping N., Pillay N., Parfitt R., Snyman S.J. (2010). Novacane® as a tool for rapid propagation of material for the SASRI plant breeding programme. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association*, 83: 117-121.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* , 15: 473-497.
- OGTR. Office of the Gene Technology Regulator. (2011). *The biology of the Saccharum spp.* Department of Health and Ageing, Australian Government. pp. 1-67
- Orozco H., Quemé J.L., Ovalle W., Castellanos S., Longo F. (2012). Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar en Guatemala. En: *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Melgar M., Meneses A., Orozco H., Pérez O., Espinoza R. (eds.). CENGICANA, Guatemala 512 p.
- Ovalle W. (2012). Enfermedades de la caña de azúcar. En: *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*. Melgar M., Meneses A., Orozco H., Pérez O. y Espinosa R. (eds.). CENGICANA, Guatemala 512 p.
- Parmessur Y., Aljanabi S., Saumtally S., & Dookum-Saumtally A. (2002). Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *Plant Pathology* , 51: 561-566.
- 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*, 100: 175-181.

Robinson R.A. (1995). Return to resistance: breeding crops to reduce pesticide dependence. Ottawa ON, IDRC; Davis, CA, agAccess, 500 p.

Shiromani W., Basnayake V., Moyle R., Birch R. (2010). Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. Plant Cell Reports , Publicado en línea.

Smith G.R., Van de Velde R. (1994). Detection of sugarcane mosaic virus and Fiji disease virus in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. Plant Disease, 78(6): 557-561.

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 Development*

and Biology of Plants Publicación en línea.

Snyman S.J., Van Antwerpen T., Ramdeen V., Meyer, G.M., Richards J.M., Rutherford R.S. (2005). Micropropagation by direct somatic embryogenesis: Is disease elimination also a possibility? Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, 27: 943-947.

Subba R.C., Sreenivasulu P. (2011). Generation of sugarcane streak mosaic virus-free sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) from infected plants by *in vitro* meristem tip culture. European Journal of Plant Pathology, 130(4): 597-604.

Taylor P., Dukic S. (1993). Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 34: 217-222.

Victoria I.J., Calderón H. (1995). Establecimiento de semilleros y multiplicación de variedades. En: El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Cassalet D.C., Torres A., Isaacs A. (eds.). Cenicaña, Colombia 394 p.

Wang Q., Cuellar W., Rajamaki L., Hirata Y., & Valkonen J. (2007). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Molecular Plant Pathology , 8(6): 1-13.

Wu L., Birch B.G. (2007). Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. Plant Biotechnology Journal 5: 109-117.