



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA
CARACTERIZACIÓN, SELECCIÓN Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA
CAÑA DE AZÚCAR EN GUATEMALA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Luis Gerardo Molina Monterroso

Dirigida por:

Dra. Carmina Gisbert Doménech

Valencia, enero 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Dña. Carmina Gisbert Doménech, doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València,

CERTIFICA:

Que **D. Luis Molina** licenciado en Ciencias Agrícolas por la Universidad de San Carlos de Guatemala, ha realizado bajo mi dirección la tesis doctoral titulada: “Desarrollo y aplicación de técnicas biotecnológicas para la caracterización, selección y mejoramiento genético de la caña de azúcar en Guatemala” y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología. Y para que así conste, firmo la presente en Valencia a 18 de diciembre de 2015

Fdo: Dra. Carmina Gisbert



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Luis Gerardo Molina Monterroso ha disfrutado de una beca financiada por el Programa de doctores del Sistema Iberoamericano de los INIA para la realización de la presente tesis doctoral.



Este trabajo fue financiado parcialmente por el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTO

**A MI DIRECTORA DE TESIS
AL GOBIERNO DE ESPAÑA
A CENGICAÑA**

Junta Directiva

Director General

**Compañeros de trabajo, en especial a mis asistentes del Área de
Biotecnología**

Por el apoyo recibido

RESUMEN

Las técnicas utilizadas en el mejoramiento de los cultivos se han venido refinando y la biotecnología con sus aplicaciones ha venido a contribuir con esta actividad y en países en desarrollo como Guatemala ya hemos comenzado a utilizarla, principalmente en la mejora genética de caña de azúcar. Dentro de las técnicas más comunes que se vienen implementando están el cultivo de tejidos y el uso de marcadores moleculares. El objetivo principal de este trabajo se centra en el aprovechamiento de estas técnicas para el desarrollo de nuevas variedades de caña de azúcar que contribuyan a aumentar la productividad incrementando la variabilidad genética que no es elevada en este cultivo. Para ello se ha iniciado la evaluación de la diversidad genética en una población de 204 variedades, utilizando tres marcadores moleculares, CV29, CV37 y CV38 que mostraron un contenido de información polimórfica (PIC) medio de 0,37, lo cual indica que fueron capaces de identificar polimorfismos en la población. Tras calcular la similitud genética entre las variedades y en base a ella, se organizaron en 20 grupos. Por otra parte, se utilizó el marcador *Bru1* asociado a la resistencia de una enfermedad de origen fúngico conocida como Roya Marrón para analizar 303 variedades (incluidas las 204 anteriores), 77 de las cuales amplificaron el marcador. La comparación con datos fenotípicos registrados durante 4 años en dos localidades confirmó que estas 77 variedades eran resistentes. Sin embargo, de las variedades que no amplificaron el alelo de resistencia, solo un 7 % se mostraron susceptibles, lo que indica la posible presencia de otro u otros alelos de resistencia. Con la información anterior se diseñaron y realizaron 22 cruzas cuyas descendencias F_1 fueron evaluadas durante dos años consecutivos registrando el promedio de cada familia para características como brix (%), altura de planta, diámetro de tallo, número de tallos por metro e incidencia de las principales enfermedades. Se obtuvieron 18 familias con brix igual o superior a la variedad control CP72-2086 (la más utilizada en Guatemala), lo que indica que podrían superar su rendimiento de azúcar como consecuencia del mayor contenido de azúcar en sus tallos, aunque no la superen en rendimiento de caña. De estos ensayos se han seleccionado cruzas en las que se ha

obtenido tolerancia para distintas enfermedades y un buen grado Brix (superior a la variedad control).

Otro problema común en el cultivo de la caña es la propagación vegetativa de plantas infectadas al utilizar material con patógenos en estado latente. En este trabajo se ha comparado la metodología DBIA (Dot Blot Immunoassay) y PCR para diagnosticar la presencia de *Xantomonas albilineans* y la amplificación de cDNA del RNA vírico para determinar la presencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV). Se ha llevado a cabo un muestreo aleatorio para detectar la incidencia de estos patógenos detectando plantas infectadas que no mostraban ninguna sintomatología. Mediante la secuenciación de un fragmento del gen de la albicidina (relacionado con la infección del patógeno) en muestras de *X. albilineans* obtenidas a partir de plantas infectadas se detectó un polimorfismo de nucleótido simple (SNP por sus siglas en inglés). También se ha comparado distintos tratamientos térmicos combinados o no con cultivo de meristemos para el saneamiento de plantas infectadas siendo el cultivo de meristemos más adecuado para materiales infectados con la bacteria y la termoterapia suficiente para la obtención de plantas libres de SCYLV. Por último, la obtención de materiales saneados, nos condujo a plantear su conservación y micropropagación utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. Las plantas saneadas y comprobadas como libres de virus se mantienen *in vitro* a una temperatura de 18°C. Se han evaluado también distintos factores que pueden influir en la regeneración adventicia a partir de explantes de hoja, entre ellos, el genotipo, posición del explante, combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de inducción y tipo de auxina para el enraizamiento de las plantas. Se ha visto un claro efecto del genotipo, de la posición del explante y de la concentración y tipo de algunos reguladores de crecimiento tanto en los porcentajes de inducción, como en el posterior desarrollo de las plantas. Se han obtenido en las mejores combinaciones hasta 32 plantas por explante. Los protocolos desarrollados son de gran interés para incrementar las tasas de multiplicación del material saneado o utilizarlos en un futuro para la mejora biotecnológica de la caña mediante transformación genética.

RESUM

Les tècniques utilitzades per a millora de cultius han començat a incorporar la biotecnologia també a països en vies de desenvolupament com és ara Guatemala on s'ha escomençat principalment en la millora de la canya de sucre. Entre les tècniques més comuns que están fent-se servir están el cultiu de teixits i l'ús dels marcadors mol.leculars. L'objectiu principal d'aquest treball es centra a l'aprofitament d'aquestes tecnologies per al desenvolupament de noves varietats de canya més productives i a l'hora amb més variabilitat genètica que és escassa en aquest cultiu. En primer lloc, s'ha avaluat la diversitat genètica en una població de 204 varietats de potencial us com a parentals. S'ha iniciat la avaluació de la diversitat genètica fent servir tres marcadors moleculars (CV29, CV37 i CV38) que mostraren un contingut d'informació polimòrfica (PIC) de 0,37 en promedi, la qual cosa indica que es varen identificar polimorfismes a la població en estudi. Es va calcular la similitud genètica entre les varietats i en base a ella, s'obtingueren 20 agrupaments. D'un altra banda va utilitzar-se el marcador *Bru1* associat a la resistència d'una enfermetat d'origen fúngic coneguda com Roya Marró per a genotipar 303 varietats (que incloïen les 204 d'avans) i, en 77, es va amplificar el esmentat marcador. La comparació amb dades fenotípiques registrades durant 4 anys en dues localitats va confirmar que les 77 varietats eren resistents però no totes aquelles que en les que no s'havia observat amplificació eren susceptibles, de fet, tan sols un 7 % ho eren. Aquest resultat és indicatiu de la possible presència d'un altre alel de resistència diferent a *Bru1*. Amb la informació obtesa es disenyaren i realitzaren 22 creuaments i les descendencies F1 es van analitzar en dues anualitats registrant dades relacionades amb el rendiment en sucre: brix (%), altura de planta, diàmetre de la tija, nombre de tiges per metre i l'incidència de las principals enfermetats que afecten a aquest cultiu. S'obtingueren 18 families amb brix equivalent o superior a la varietat control CP72-2086, que podrien superar el rendiment en sucre, encara que no la superen en rendiment en canya. En aquest treball s'han sel.leccionat creuaments que

han mostrat tolerància a diferents enfermetats i un bon grau de Brix (superior a la varietat control).

Un altre problema comú al cultiu de la canya és la propagació vegetativa a partir de plantes infectades amb patògens que s'hi troben en estat de latència. En aquest treball s'ha comparat la DBIA (Dot Blot Immunoassay) i la PCR per a diagnosticar la presència de *Xantomonas albilineans* i s'ha utilitzat l'amplificació de cDNA del RNA víric per determinar la presència del virus de la fulla groga (SCYLV). S'ha fet un anàlisi aleatori en diferents zones de cultiu per a determinar la incidència d'aquests patògens detectant-se plantes infectades que no mostraven símptomes. La seqüenciació de part del gen de la albicidina (relacionat amb la infecció del patògen) en mostres de plantes infectades ha permès la detecció d'un polimorfisme de nucleòtid únic. També s'han comparat diferents tractaments tèrmics en combinació o no de cultiu de meristems per obtenir plantes sanejades sent, el cultiu de meristems més adequat en el cas del bacteri i, la termoteràpia suficient per a la virosi. L'obtenció de materials sanejats ens va portar a plantejar la seua conservació en cultiu *in vitro*. Les plantes sanejades es mantenen a una temperatura de 18°C. També en aquest contexte, s'han avaluat diferents factors que poden influenciar amb la regeneració adventícia a partir de segments de fulla, entre ells: el genotip, la posició de l'explant a la planta, les combinacions de reguladors de creixement, i el tipus d'auxina per enraïlar les plantes. S'ha vist un marcat efecte del genotip, de la posició de l'explant i de la concentració d'alguns reguladors de creixement tant en els percentatges d'inducció com en el posterior desenvolupament de les plantes. S'ha obtingut en la millor combinació fins a 32 plantes per explant. Els protocols de regeneració adventícia que s'han desenvolupat són de gran interès per a incrementar la multiplicació del material sanejat així com per a utilitzarlos en un futur per a la millora biotecnològica de la canya mitjançant la transformació genètica.

ABSTRACT

The techniques used in crop improvement have been refined and biotechnology applications have mainly contributed to this activity. In developing countries such as Guatemala these techniques have already begun to use, mainly in the genetic improvement of sugarcane. Among the most common techniques being implemented are tissue culture and the use of molecular markers. The main objective of this work focuses on the use of both techniques to develop new varieties of sugarcane for increasing productivity as well as the genetic variability that is narrow in this crop. With this purpose we have initiated the genetic diversity analysis in a population of 204 varieties (of putative use as parental) using three molecular markers (CV29, CV37 and CV38) which showed an average polymorphic information content (PIC) of 0.37. This indicates that they are polymorphisms in the population. The comparison of genetic similarity between the varieties derived 20 groups of varieties. Moreover, the *Bru1* marker associated with resistance of a fungal disease known as brown rust was used to analyze 303 varieties (including the 204 previously used). We obtained amplification in 77. The comparison with phenotypic data recorded during four years at two locations confirmed that these 77 varieties were resistant. However, those that did not amplify included plants that showed resistance (68%) and susceptibility (7%), indicating the putative presence of different resistant alleles. With the above information we design and conduct 22 cross whose offspring F_1 were evaluated for four consecutive years recording with the average of each family to features like Brix (%), plant height, stem diameter, number of stems per meter and incidence of major diseases. From 22 crosses, 18 families showed equal or higher values of brix respect the control variety CP72-2086. This result is promising for increasing sugar yield despite these varieties did not exceed in mass of cane. Several varieties with high Brix and tolerance to different diseases have been selected.

Another important problem in sugarcane is the propagation of materials from plants that were pathogen-infected but do not manifest disease symptoms. In this work the DBIA (Dot Blot Immunoassay) methodology and the PCR was used for detecting *Xantomonas albilineans*; RT-PCR was used to amplify SCYLV (Sugar Cane Yellow Leaf Virus). We performed a Random screening to evaluate the incidence of both pathogens confirming their presence in plants symptomless. Sequencing a fragment of albicidin gene of *X. albilineans* (related with pathogen infection) we found an SNP (single nucleotide polymorphism). We have compared thermotherapy in combination or not with meristem culture for plant sanitation. Whereas meristem culture was more appropriated for rescue plants free of *X. albilineans*, thermotherapy is sufficient for obtaining virus (SCYLV) free plant. The achievement of pathogen free plants let us to use *in vitro* culture techniques for conservation and micropropagation. Sanitized plants are maintained *in vitro* at a temperature of 18°C. We evaluated several factors that may influence the adventitious regeneration from leaf explants (that may increase multiplication). These factors included genotype, explant position, combinations of growth regulators in the induction medium and auxin type for rooting. A great influence of genotype was manifested as well as the position of the explant and the concentration and type of some growth regulators were also influencing both the percentages of induction and subsequent development of the plants. In the best combination 32 plants per explant were regenerated. The protocols developed in this work are of interest to increase multiplication rates of sanitized materials and are a good base to use them in the future sugarcane improvement through genetic transformation.

INDICE

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La caña de azúcar	3
1.2 Taxonomía y filogenia	3
1.3 Origen y domesticación.....	4
1.4 El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala	5
1.4.1 Ubicación geográfica de la zona cañera de Guatemala	6
1.5 Importancia económica de la caña de azúcar en el mundo y en Guatemala	7
1.6 Factores bióticos que limitan el cultivo de caña de azúcar en Guatemala.....	10
1.7 Mejora genética de la caña de azúcar	11
1.8 Programa de mejora genética en Guatemala.....	13
1.9 Necesidades de mejora genética con relación a enfermedades en Guatemala.....	14
1.9.1 Escaldadura foliar.....	15
1.9.2 Síndrome de la hoja amarilla.....	17
1.10 Técnicas de cultivo <i>in vitro</i> utilizadas para la mejora de la caña de azúcar. Producción de plantas libres de patógenos, micropropagación y conservación de germoplasma.	19
1.10.1 Producción de plantas libres de patógenos.....	20
1.10.2 Micropropagación	21
1.10.3 Conservación de Germoplasma	22
1.11 Uso de marcadores moleculares en caña de azúcar	22
1.11.1 Marcadores para mapeo genético	23
1.11.2 Marcadores para selección asistida e identificación varietal.....	24
1.11.3 Marcadores moleculares para el análisis de la diversidad genética	25
1.11.4 Marcadores moleculares para diagnóstico de patógenos	26
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar y selección de materiales de interés utilizando marcadores moleculares.....	35
3.1.1 Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar utilizando marcadores tipo microsatélite	35
3.1.2 Identificación de materiales de interés portadores del alelo <i>Bru1</i> asociado con la resistencia a la enfermedad de la roya marrón y análisis de correlación genotipo-fenotipo.	40

3.2	Obtención de híbridos de interés en la mejora genética de caña de azúcar. Identificación de cruza superiores mediante evaluación de familias F ₁	43
3.3	Diagnóstico, caracterización y prospección de <i>Xanthomonas albilineans</i> y virus de la hoja Amarilla de la Caña de Azúcar en distintas zonas de cultivo de caña de Guatemala. Evaluación de metodologías para saneamiento de materiales infectados.	45
3.3.1	Obtención de tallos infectados	45
3.3.2	Diagnóstico de <i>Xanthomonas albilineans</i>	47
3.3.3	Diagnóstico del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV)	48
3.3.4	Caracterización de cepas de <i>Xanthomonas albilineans</i> con base en secuencias genómicas 49	
3.3.5	Prospección	50
3.3.6	Tratamientos para la eliminación del patógeno	50
3.3.7	Brotación de yemas y cultivo de meristemas	50
3.4	Desarrollo de una metodología para la conservación y propagación <i>in vitro</i> de germoplasma de caña de azúcar	52
3.4.1	Establecimiento y cultivo de las plantas <i>in vitro</i> . Evaluación de la respuesta morfogénica en segmentos de hoja en medio de inducción MS: efecto del genotipo y del tipo de explante.....	52
3.4.2	Evaluación de distintas combinaciones de reguladores del crecimiento en la multiplicación de plantas	54
3.4.3	Enraizamiento de plantas <i>in vitro</i> y su supervivencia al trasplante	56
3.4.4	Inducción de la regeneración a partir de explantes de hoja. Efecto del genotipo y la concentración de 2,4-D	57
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1	Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar y selección de materiales de interés utilizando marcadores moleculares.....	61
4.1.1	Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar utilizando marcadores tipo microsatélite.	61
4.1.2	Identificación de materiales de interés portadores del alelo <i>Bru1</i> asociado con la resistencia a la enfermedad de la roya marrón y análisis comparativo del fenotipo	72
4.2	Obtención de híbridos de interés en la mejora genética de caña de azúcar e identificación de cruza superiores mediante evaluación de familias F ₁	75
4.3	Diagnóstico, caracterización y prospección de <i>Xanthomonas albilineans</i> y virus del Amarillamiento de la Caña de Azúcar en distintas zonas de cultivo de caña de Guatemala. Evaluación de metodologías para saneamiento de materiales infectados.	83
4.3.1	Diagnóstico y prospección de las enfermedades de la escaldadura foliar y la causada por el virus del amarillamiento en zonas de cultivo de caña en Guatemala.	84
4.3.2	Diagnóstico y prospección de <i>Xanthomonas albilineans</i>	84
4.3.3	Caracterización de cepas de <i>Xanthomonas albilineans</i> con base en secuencias genómicas 88	
4.3.4	Diagnóstico y prospección de virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar	90
4.3.5	Saneamiento de material vegetal	92

4.3.6	Saneamiento de plantas infectadas con <i>X. albilineans</i>	94
4.3.7	Saneamiento de plantas infectadas con SCYLV	95
4.4	Desarrollo de metodologías de cultivo <i>in vitro</i> para la conservación y propagación de material saneado. Evaluación de distintos factores para la inducción de la regeneración a partir de explantes de hoja en genotipos de interés	97
4.4.1	Conservación y propagación de material saneado	97
4.4.2	Inducción de la regeneración a partir de explantes de hojas	98
4.4.3	Influencia del tipo de explante (parte basal o distal de la hoja) y del genotipo en la regeneración	99
4.4.4	Evaluación de distintas combinaciones de reguladores del crecimiento en la multiplicación de plantas	102
4.4.5	Efecto de la concentración de 2,4-D	107
5.	CONCLUSIONES	112
6.	BIBLIOGRAFÍA	118
7.	Anexos	130

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 La caña de azúcar

La caña de azúcar es una planta monocotiledónea de rápido crecimiento que se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, principalmente por su capacidad para almacenar en sus tallos grandes concentraciones de sacarosa. Es un cultivo ancestral cuyo uso se remonta aproximadamente 4.500 años atrás. En la actualidad, la caña de azúcar se cultiva de forma comercial principalmente en Sudamérica (e.g. Brasil, Colombia y Argentina), Norte y Centroamérica (e.g. México, Estados Unidos y Guatemala), Asia (e.g. India, China y Tailandia), África (e.g. Sudáfrica Zimbawe y Egipto), Australia y las Islas del Pacífico (OGTR, 2011). La caña de azúcar se cultiva por su sacarosa, la cual puede ser utilizada como edulcorante, como sustrato para variadas síntesis químicas o para fermentación en la producción de bebidas alcohólicas o bioetanol combustible (SCOPE, 2015). La caña cruda puede ser exprimida o masticada para extraer el jugo. En algunos países se embotella para distribución local o se consume fresco en bares de jugos, cafés y restaurantes. Fuera de su procesamiento comercial ocurre un procesamiento artesanal, donde el jugo de caña es hervido y luego enfriado para fabricar bloques de azúcar moreno no refinado, conocido como rapadura en Brasil y panela en Colombia (OECD, 2013).

1.2 Taxonomía y filogenia

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum* L., de la tribu Andropogoneae en la familia de las gramíneas (Poaceae). Esta tribu incluye gramíneas tropicales y subtropicales y cereales de los géneros *Sorghum* (sorgo) y *Zea* (maíz). 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

1. Introducción

taxonómicas (OGTR, 2008). Con base en la taxonomía convencional, el género *Saccharum* incluye seis especies, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* y *S. edule* (Figura 1).

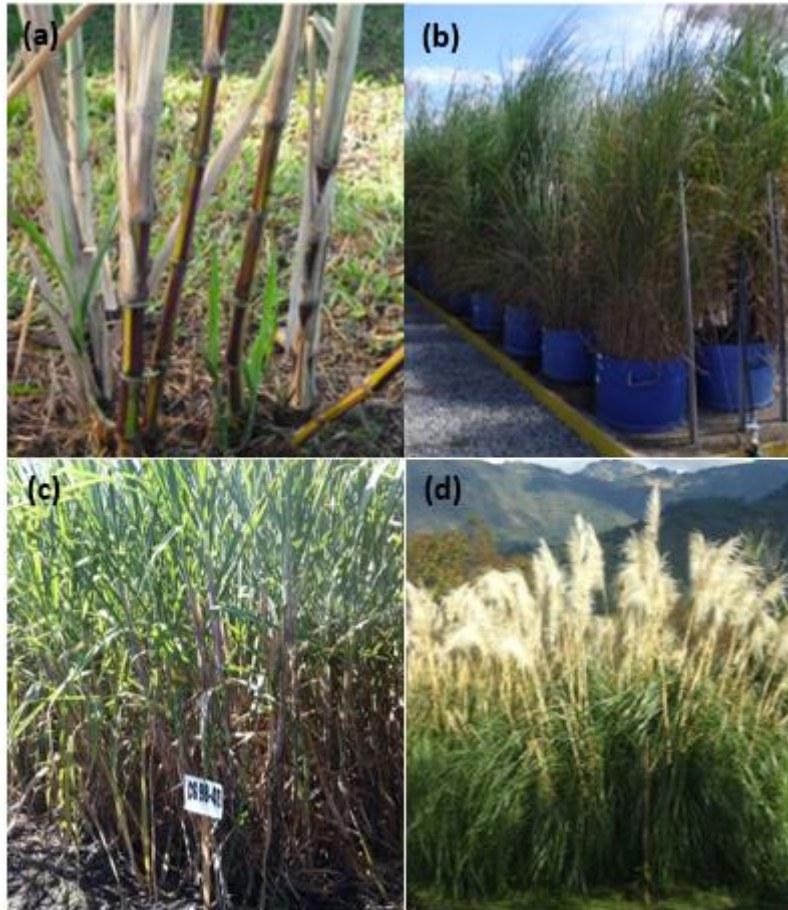


Figura 1. Algunos géneros y especies del complejo *Saccharum* (a) *S. officinarum* (b) *S. spontaneum* (c) cultivar comercial derivado de híbridos interespecíficos *S. officinarum* x *S. spontaneum* (d) *Miscanthus sinensis*

1.3 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 % de su peso fresco y alrededor de 50 % de su peso seco como sacarosa (Dillon *et al.* 2007).

El cultivo de la caña de azúcar, se dispersó de la India al Oriente Medio, el Mediterráneo y el Nuevo Mundo en 1493, antes de que Linneo estableciera su clasificación en 1753 y antes del descubrimiento de las cañas “nobles” en las islas de los mares del sur. La primera de las cañas nobles dejó Tahiti con Bougainville en 1768, arribando eventualmente al Caribe en 1789. La caña de azúcar que se dispersó a través del Mediterráneo hacia el Nuevo Mundo fue el cultivar Indio

1. Introducción

conocido como “Creole” por los franceses, “Criola” en español o “Crioula” en portugués (Moore *et al.*, 2014). De acuerdo con Robinson (1995), esta caña “criolla” era en realidad *Saccharum barberi*.

El cultivo de “Creole” fue rápidamente reemplazado por el cultivar noble “Otahití” cuando Bligh lo introdujo a Jamaica proveniente de Tahití en 1793. De ahí fue distribuido a través del Caribe y las Américas. Las cañas nobles originales recolectadas de las islas del Pacífico rápidamente reemplazaron a las variedades de la India menos productivas y fueron la única fuente de cultivares para las plantaciones, por más de cien años, para la producción mundial de azúcar. Antes de que los programas de mejoramiento de caña de azúcar comenzaran en 1888, los cultivares nobles más importantes fueron “Otahití” (“Bourbon”, “Lahaina”) de Tahití, “Cheribon” (“LouisianaPurple”) de Java y “Caledonia” de las Nuevas Hébridas. “Bourbon” fue extremadamente susceptible a la pudrición de raíz, el mosaico y la enfermedad gomosa, “Cheribon” al sereh, mosaico y pudrición radicular y “Caledonia” al mosaico. Estos cultivares iniciales fueron reemplazados por nuevos híbridos seleccionados por los programas emergentes de mejoramiento de caña de azúcar resistentes a estas enfermedades (Moore *et al.*, 2014).

1.4 El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala

En Guatemala, la caña de azúcar comenzó a cultivarse en 1536 en Amatitlán. Los primeros trapiches (molinos) se fundaron en el valle central de Guatemala y en el valle de Salamá durante el siglo XVI. En el siglo XVII creció el número de trapiches, estando los más importantes en manos de las órdenes religiosas. A mediados del siglo XIX Guatemala comenzó a exportar azúcar en cantidades menores. En 1960 Guatemala recibió su primera cuota de Estados Unidos, en ese tiempo, la producción total de azúcar de Guatemala fue de 68.000 toneladas métricas. Al expandirse las exportaciones de azúcar, los ingenios (haciendas para procesar caña de azúcar) introdujeron mejoras en el cultivo, la cosecha, la fábrica, la distribución y comercialización del producto, así como mejores condiciones de vida para los trabajadores de la agroindustria azucarera (CENGICAÑA, 2012).

1.4.1 Ubicación geográfica de la zona cañera de Guatemala

La Agroindustria Azucarera de Guatemala está conformada por 12 ingenios azucareros, los cuales se encuentran distribuidos geográficamente de la siguiente manera: Diez de ellos se ubican en la planicie costera del Océano Pacífico o costa sur de Guatemala y ocupan la casi totalidad del área sembrada con caña (99 %). Estos ingenios son Tululá, Palo Gordo, Madre Tierra, La Unión, Pantaleón, Concepción, Magdalena, Santa Ana, Trinidad y El Pilar. Los otros dos ingenios se localizan en diferentes lugares de la república y ocupan áreas relativamente pequeñas. En el municipio de Villa Canales del departamento de Guatemala se encuentra el ingenio Santa Teresa, y en el departamento de Santa Rosa se encuentra el ingenio La Sonrisa (CENGICAÑA, 2012).

La zona cañera de la costa sur de Guatemala se encuentra ubicada entre las coordenadas geográficas 91°50'00" – 90°10'00" Longitud Oeste y 14°33'00" – 13°50'00" Latitud Norte. Geopolíticamente está localizada en los departamentos de Retalhuleu, Suchitepéquez, Escuintla, Santa Rosa y actualmente se está expandiendo hacia el departamento de Jutiapa (Figura 2).

La zona cañera se encuentra en las cuencas de los ríos Ocosito, Samalá, Sis-Icán, Nahualate, Madre Vieja, Coyolate, Acomé, Achiguate, María Linda, Paso Hondo, Los Esclavos y La Paz, las cuales se originan en la parte alta de la zona y desembocan en el Océano Pacífico (CENGICAÑA, 2012).

1. Introducción

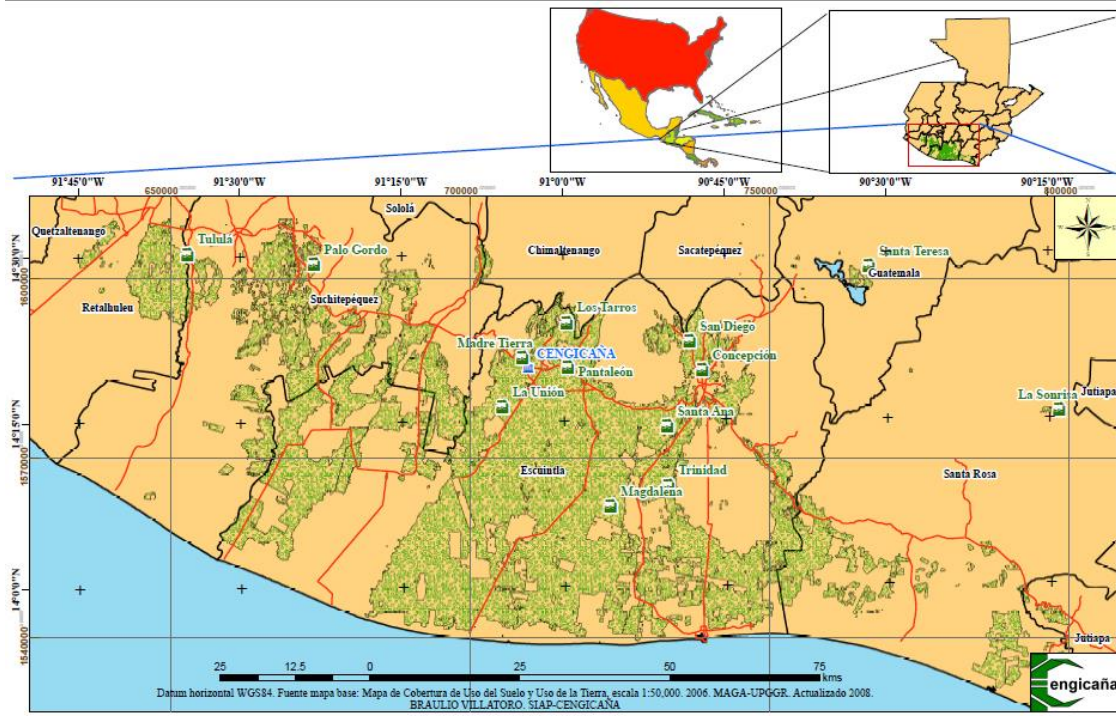


Figura 2. Ubicación geográfica de la zona cañera de Guatemala y de los ingenios azucareros. Fuente: CENGICAÑA (2012).

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

La caña de azúcar (*Saccharum* sp.) es un cultivo importante de propagación vegetativa que se siembra por sus tallos ricos en azúcar. Es además, el cultivo industrial más cercano a la sostenibilidad como fuente renovable de energía (Wu y Birch, 2007).

Cerca del 75 % 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) y es el cultivo con mayor producción en todo el mundo. Como se muestra en la Figura 3, la producción mundial de caña de azúcar durante el año 2013 se estimó en 1.911 millones de toneladas, con un valor promedio de 64.000 millones de dólares entre el período 2004-2006 (FAO, 2015).

1. Introducción

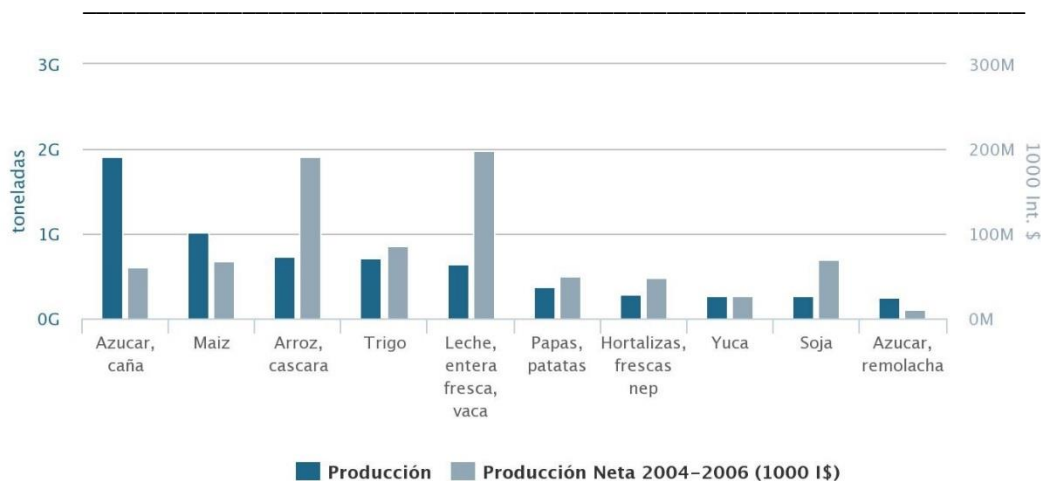


Figura 3. Cultivos con las mayores producciones a nivel mundial en el año 2013 y producción neta promedio 2004-2006 (Fuente: FAO, 2015).

Guatemala es el quinto mayor exportador de azúcar en el mundo (Cuadro 1) y el tercero en producción por hectárea. El azúcar representa el 10,38 % de las exportaciones totales del país y el 20,95 % de las exportaciones agrícolas, generando US\$ 505,3 millones en ingreso de divisas durante el año 2011 (ASAZGUA, 2012).

Cuadro 1. Principales países en el sector azucarero (Jenkins, Baptista y Porth, 2015)

Principales productores	Producción (TM)	Principales exportadores	Exportación (TM)
Brasil	36.800.000	Brasil	25.250.000
India	27.900.000	Tailandia	8.300.000
Unión Europea	16.300.000	Australia	3.300.000
China	13.700.000	México	2.158.000
Tailandia	11.000.000	Guatemala	1.950.000
Principales consumidores	Consumo (TM)	Principales importadores	Importación (TM)
India	27.000.000	Unión Europea	3.750.000
Unión Europea	18.500.000	Indonesia	3.750.000
China	17.400.000	China	3.300.000
Brasil	11.355.000	Estados Unidos	2.806.000
Estados Unidos	10.614.000	Emiratos Árabes Unidos	2.250.000

1. Introducción

Durante el quinquenio 2006/2007 – 2010/2011, las producciones de caña de azúcar en Guatemala se mantuvieron alrededor de veinte millones de toneladas métricas (Cuadro 2), en un área promedio de 230,000 hectáreas distribuidas en la planicie de la costa sur.

Cuadro 2. Producción de azúcar en Guatemala 2006/2007 – 2010/2011

Año Zafra	Área (ha)	Caña molida TM	Azucar			RENDIMIENTO		
			Azucar TM	Exportada TM	Azucar (%)	Caña (TM/ha)	Azucar (TM/ha)	Azucar (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

Fuente: CENGICAÑA, 2011.

Además del azúcar, la Agroindustria Azucarera de Guatemala es la mayor productora de alcohol en la región Centroamericana, sin disminuir la producción de azúcar ya que el alcohol se fabrica a partir de mieles, las cuales son un subproducto en la elaboración de azúcar. En la actualidad, cinco empresas en donde participan algunos ingenios realizan este proceso, alcanzando una producción de 265 millones de litros al año, generando divisas para el año 2011 de US\$70.5 millones (ASAZGUA, 2012).

Del proceso de la caña también se aprovecha el bagazo para la cogeneración de 19 % de energía eléctrica en época de zafra (cosecha) dentro del Sistema Nacional Interconectado –SIN-, que representa 331MW de potencia (Cuadro 3). Los ingenios en época de zafra uniendo la venta más su consumo propio generan los 1.300GWh que produce la hidroeléctrica de Chixoy en un año (ASAZGUA, 2012).

Cuadro 3. Capacidad instalada de los ingenios para la cogeneración de energía eléctrica

Ingenio	Potencia (MW)
Pantaleón	60,25
Concepción	26,00
Magdalena	111,24
La Unión	37,00
Madre Tierra	21,34
Santa Ana	35,43
Tululá	12,60
El Pilar	3,50
Trinidad	24,27
Total Ingenios	331,63

Fuente: ASAZGUA (2012)

1.6 Factores bióticos que limitan el cultivo de caña de azúcar en Guatemala

La caña de azúcar como cualquier otro cultivo, se ve afectado por plagas y enfermedades que limitan su potencial de producción. Entre las principales plagas de tallo y hoja se mencionan a los barrenadores del género *Diatraea*, chinche salivosa (*Aeneolamia postica*) y (*Prosapia simulans*), la chinche de encaje (*Leptodyctia tabida*), coludo o saltahojas antillano (*Saccharosydne saccharivora*), saltahojas hawaiano (*Perkinsiella saccharicida*), pulgón dorado (*Sipha flava*). El complejo de plagas de la raíz incluye gallina ciega (*Phyllophaga* spp.), gusano alambre (*Dipropus* spp.) y chinche hedionda (*Scaptocoris talpa*). También se incluye roedores como la rata (*Sigmodon hispidus*) y la taltuza (*Orthogeomys hispidus*) (CENGICAÑA, 2012).

Las enfermedades que afectan el cultivo de caña de azúcar se pueden clasificar de acuerdo al tipo de patógeno causante, en enfermedades causadas por hongos, como el carbón (*Sporisorium scitamineum*), roya marrón (*Puccinia melanocephala*), roya naranja (*Puccinia kuehnii*), cogollo retorcido o pokkahboeng (*Giberella moniliformis*) y mancha púrpura (*Dimeriella sacchari*), enfermedades causadas por bacterias como la escaldadura foliar (*Xanthomonas*

1. Introducción

albilineans), raquitismo de las socas (*Leifsonia xyli*) y enfermedades causadas por virus como el mosaico de la caña de azúcar –SCMV- (Sugar Cane Mosaic Virus), hoja amarilla o amarillamiento foliar cuyo causante puede ser el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar –SCYLV- (Sugar Cane Yellow Leaf Virus) o el fitoplasma del amarillamiento de la caña de azúcar –SCYP- (Sugar Cane Yellow Phytoplasma) (CENGICAÑA, 2012).

1.7 Mejora genética de la caña de azúcar

Los primeros programas de mejoramiento comenzaron en Java y Barbados en 1888, tras comprobar que la caña de azúcar era capaz de producir semilla viable en ensayos realizados independientemente en Java (1858) y Barbados (1859). Las variedades producidas por la Proefstation Oost Java, identificadas como variedades POJ, resultaron fundacionales para el desarrollo de germoplasma en otros países, los cuales rápidamente establecieron sus propias estaciones de mejoramiento para producir variedades adaptadas localmente. Dentro de los esfuerzos notables por producir variedades de amplia adaptación destacó Coimbatore, India (1912), que desarrolló las variedades Co y NCo (Moore *et al.*, 2014).

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 nubilización), 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 $2n =$

1. Introducción

130 cromosomas, de los cuales 10 – 25 % pertenecen a *S. spontaneum* (D’Hont *et al.* 1996) como se muestra en la Figura 4.

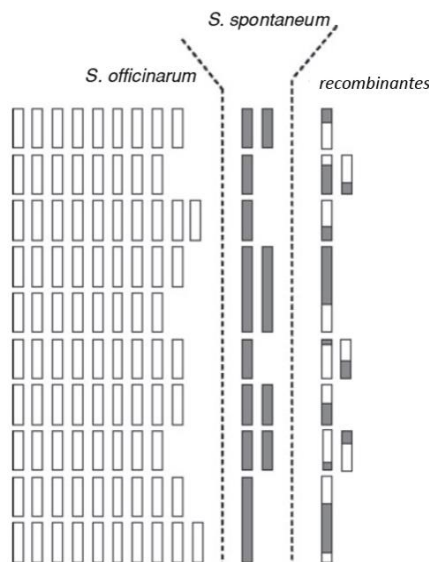


Figura 4. Esquema del genoma de un cultivar moderno típico de caña de azúcar. Cada barra representa un cromosoma; las cajas en blanco representan regiones que se originan de *S. officinarum* y las cajas sombreadas regiones que se originan de *S. spontaneum*. Los cromosomas alineados en la misma fila son hom(eo)logos y representan un grupo de homología (HG). Los cromosomas ensamblados verticalmente corresponden a genomas monoploides (MG) de *S. officinarum* y *S. spontaneum*. Las características principales de este genoma son el alto nivel de ploidía, la aneuploidía, el origen bi-específico de los cromosomas, la existencia de diferencias estructurales entre los cromosomas de dos orígenes y la presencia de cromosomas interespecíficos recombinantes. Fuente: Moore *et al.*, 2014.

Uno de los productos de la nobilitación, la variedad POJ2878 (Figura 5) mostró un éxito tan grande que en 1929 ocupaba el 90 % 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).

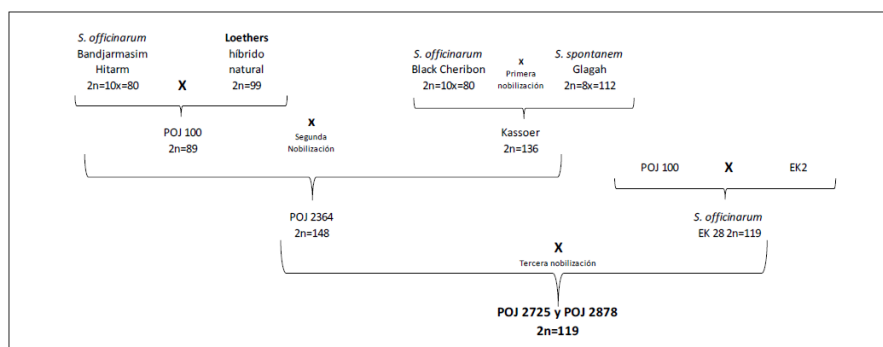


Figura 5. Diagrama que muestra el desarrollo y el pedigrí de las variedades POJ 2725 y POJ 2878. Fuente: CENGICAÑA (2012).

La hibridación interespecífica entre *S. officinarum* como progenitor femenino y *S. spontaneum* como progenitor masculino produce progeñie 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).

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 progeñies variables mediante polinización cruzada; y selección de clones útiles (Hogarth y Berding, 2005).

1.8 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 CENGICAÑA, inició sus

1. Introducción

actividades en el año de 1992 y fue establecido con una estrategia general que contempla tres componentes principales: a) estudios de variabilidad genética (germoplasma y cruzamientos), b) evaluación y selección de germoplasma 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 (rebrote). 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.

1.9 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. En segundo lugar, las virosis producidas por el

1. Introducción

mosaico de la caña de azúcar, enfermedad de la raya roja y el amarillamiento foliar y en el tercer lugar, cogollo retorcido (Pokkahboeng), mancha púrpura, mancha amarilla y raya clorótica (Ovalle, 2012). A continuación se hace una breve descripción de las enfermedades involucradas en el presente trabajo:

1.9.1 Escaldadura foliar

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en el norte de Australia en 1911 y desde entonces se ha reportado en todos los continentes productores de caña (Rott y Davis 1996). Los brotes de escaldadura foliar en Guatemala, Luisiana, Mexico y Texas fueron atribuidos a la introducción del patógeno con materiales infectados, mientras que en áreas como Florida y Mauricio la enfermedad ha sido endémica durante muchos años previos a los brotes recientes (Davis *et al.*, 1997).

La 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). 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 %.

Síntomas

Los síntomas de la enfermedad en la hoja varían desde una simple y angosta línea blanca finamente definida, hasta una completa pudrición y necrosis de las hojas infectadas, llegando a matar la planta en los cultivares más susceptibles. Un síntoma común en la caña madura es el desarrollo anormal de brotes laterales en los tallos (Champoiseau *et al.*, 2006).

Con frecuencia se encuentra latencia en la infección, haciendo imposible el diagnóstico visual, de tal forma que el patógeno es diseminado consistentemente a través de tallos infectados, utilizados como semilla para la propagación de los cultivos a nivel local, así como con el intercambio de semilla a nivel internacional (Huerta-Lara *et al.*, 2009).

La bacteria *X. albilineans* produce una familia de novedosas fitotoxinas y antibióticos de bajo peso molecular llamadas albicidinas. La evidencia genética indica que las albicidinas son responsables por los síntomas cloróticos característicos de la caña infectada con la bacteria y parecen jugar un rol importante en el desarrollo sistémico de la enfermedad (Zhang, Xu y Birch, 1999).

Control de la enfermedad

De acuerdo con Sandhu *et al.*, (2013), el mejor control para esta enfermedad es la sustitución de variedades susceptibles por resistentes. Sin embargo, debido a que es una enfermedad latente, es recomendable el tratamiento de la semilla vegetativa dando una inmersión de 24 horas en agua circulante y luego en agua a 50°C durante tres horas. El tratamiento más corto de dos horas a 50°C utilizado para controlar la enfermedad conocida como raquitismo de las socas, solo controla parcialmente la escaldadura.

Variabilidad de Xanthomonas albilineans

Analizando la reacción de la bacteria a anticuerpos (serología), Rott y Davis (1996) reportan haber identificado tres serotipos I, II y III. En el tipo I se incluyen cepas ampliamente distribuidas, mientras que en el tipo II aquellas aisladas

1. Introducción

mayoritariamente en el continente africano y el tipo III que es el menor, incluye cepas de las Antillas, Brasil y algunas islas del sudeste asiático. También clasificaron estas cepas mediante la técnica de RFLP, identificando 4 grupos. No encontraron correlación significativa entre ambas clasificaciones pero hallaron que en la mayoría de localidades prevalecía un serovar y un grupo RFLP, lo cual indica que es importante evitar en cada región el ingreso de otras cepas del patógeno. Otros grupos de investigación sin embargo, sí han encontrado correlación entre los grupos serológicos y de ADN (Alvarez *et al.*, 1996; Jaufeeraly-Fakim *et al.*, 2000).

Utilizando la técnica de RFLP, con dos sondas conteniendo secuencias del conjunto de genes de la albicidina, Champoiseau *et al.*, (2006) identificaron 14 haplotipos y dos grupos genéticos ALB-RFLP 1 y ALB-RFLP 2, sin embargo, no encontraron ninguna relación entre esta variabilidad genética y la cantidad de albicidina producida *in vitro* por la bacteria.

Diagnóstico mediante marcadores moleculares

Rott *et al.* (1996) mediante mutagénesis inducida con transposones, obtuvieron mutantes defectuosos para producir albicidina y demostraron con el mapa de restricción, que la producción de albicidina está asociada con un conjunto de genes que abarcan una región genómica de 48 kpb y los fragmentos de esta región probaron ser muy específicos de *X. albilineans*.

Mediante el análisis de la secuencia del complejo de genes de la albicidina, Davis, Rott y Astua-Monge (1998) diseñaron oligonucleótidos y desarrollaron una metodología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *X. albilineans* en caña de azúcar. La técnica de PCR anidada amplifica un fragmento de 440 pb en la primera reacción y uno de 308 pb en la segunda, cuando la bacteria está presente en la planta.

1.9.2 Síndrome de la hoja amarilla

El síndrome de la hoja amarilla de la caña de azúcar –YLS- (Yellow Leaf Syndrome) 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

1. Introducción

amarillamiento de la nervadura central, 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 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” (Ovalle, 2012).

El virus del amarillamiento de la caña de azúcar pertenece al género Poleovirus de la familia Luteoviridae (ElSayed y Weig, 2010).

Síntomas

Los síntomas de SCYLV son más evidentes en plantas maduras y estresadas. Inician con el amarillamiento de la parte inferior de la vena central de las hojas 3 a 6 contando desde la primera hoja expandida en el ápice hacia abajo. El amarillamiento se expande luego a la lámina foliar desde la punta de la hoja hacia la vaina (Comstock y Miller, 2003).

Las plantas pueden mostrar efecto en el crecimiento (enanismo) dependiendo de la susceptibilidad de la variedad. En casos muy severos se observa muerte del meristemo apical y emisión de raíces adventicias en el ápice del tallo. También se ha encontrado cierta asociación entre bajas temperaturas y mayor severidad, por lo cual, ciertas variedades muestran mayores problemas con la enfermedad en zonas altas (CENGICAÑA, 2012).

Control de la enfermedad

Debido a que las plantas infectadas con SCYLV son frecuentemente asintomáticas y que los métodos eficientes para diagnóstico estuvieron

1. Introducción

disponibles hasta finales de 1990, la enfermedad se propagó por todo el mundo a través de germoplasma infectado (Girard *et al.*, 2010).

Para su control se recomienda el uso de variedades resistentes y el uso de plantas sanas. Para esto último, el cultivo de tejidos ha resultado ser una herramienta eficiente. Snyman *et al.* (2005) y Parmessur *et al.* (2002) reportaron haber eliminado el SCYLV y haber regenerado plantas sanas utilizando cultivo de tejidos.

Por otra parte, Chatenet *et al.* (2001) encontraron que los tratamientos hidrotérmicos para controlar otras enfermedades en caña de azúcar, no fueron efectivos para eliminar el virus en material infectado.

Variabilidad del SCYLV

Varios estudios han demostrado que el SCYLV es un virus muy variable. Los estudios filogenéticos de Abu Ahmad *et al.* (2006) identificaron cuatro genotipos del virus: BRA, CUB, PERU y REU. También se han reportado variaciones en la capacidad de infección y virulencia entre los diferentes genotipos.

Diagnóstico mediante marcadores moleculares

Chatenet *et al.* (2001) indican que el virus fue diagnosticado mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR) por primera vez en 1996 en el Centro de Cooperación Internacional de Investigación Agropecuaria para el Desarrollo (CIRAD por sus siglas en francés) y entre 1997 y 2000 también por TBIA (Tissue Blot Immunoassay). En ambos casos, el mayor porcentaje de haces vasculares infectados se encontró en las hojas superiores.

1.10 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 (Gisbert *et al.*, 2008). 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:

1.10.1 Producción de plantas libres de patógenos

El cultivo de meristemas 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 meristemas 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, virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, virus del mosaico de la caña de azúcar y escaldadura foliar.

- Ramgareeb *et al.* (2010) utilizaron el cultivo de meristemas 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 meristemas.

La utilización de marcadores moleculares para confirmar la presencia de patógenos y su identificación antes de obtener los meristemas y/o confirmar la ausencia de estos 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)

1.10.2 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 meristemas (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

1. Introducción

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, pero en todos ellos elevadas. Por ejemplo, en el trabajo de Meyer *et al.* (2010) se obtiene 1.600 plantas por meristemo en 5 meses y esta misma cantidad de plantas es obtenida por Victoria y Calderón (1995) en 3 meses. Una eficiencia algo menor es la reportada por Ramgareeb *et al.* (2010) que obtuvieron 1.300 brotes a partir de un meristemo en 11 semanas.

1.10.3 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 yemas apicales como explante. Disponer de clones mantenidos *in vitro* y obtenidos a partir de planta sana facilita el intercambio de germoplasma entre instituciones y el suministro de materiales sanos a demanda.

1.11 Uso de marcadores moleculares en caña de azúcar

Roughan *et al.*, (1971) reportaron por primera vez el uso de marcadores moleculares en caña de azúcar. Analizando la variación de la isoenzima β -amilasa en *S. officinarum*, *S. spontaneum* y la progenie F_1 originada de su cruzamiento, fueron capaces de diferenciar los genotipos de cada una de las dos especies, así como los de la progenie híbrida y la resultante de autofecundación, aunque no encontraron ninguna correlación entre los marcadores y el contenido de almidón en el tallo de la planta.

1. Introducción

Actualmente los marcadores más utilizados son los de ADN. Estos pueden obtenerse por 1) restricción de fragmentos 2) amplificación de fragmentos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los marcadores moleculares se han utilizado en caña de azúcar con varios propósitos, como comprender el origen de los cultivares comerciales, determinar la diversidad genética, identificación de variedades, identificación de loci de características cuantitativas (QTL), análisis genómico funcional y estructural y diagnóstico de patógenos (Lackshmanan *et al.*, 2005).

1.11.1 Marcadores para mapeo genético

Al Janabi *et al.* (1993) publicaron el primer mapa genético de *Saccharum* para el clon 'SES 208' de *S. spontaneum*. Los marcadores fueron generados utilizando polimorfismos de ADN amplificado aleatoriamente (RAPDs por sus siglas en inglés), en una progenie proveniente del cruzamiento de 'SES 208' y una planta doble haploide proveniente de la misma variedad.

La cada vez mayor disposición de marcadores moleculares ha dado lugar a que se elaboren varios mapas genéticos de la caña de azúcar. Da Silva *et al.*, (1993), utilizando marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism por sus siglas en inglés), Hoarau *et al.*, (2001) utilizando marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Aitken *et al.*, (2005) utilizando AFLP, y SSR (Simple Sequence Repeats). Estos trabajos de mapeo han permitido a la vez, identificar marcadores QTL (Quantitative Trait Loci) posiblemente asociados a características de interés agronómico o industrial.

En caña de azúcar, los marcadores moleculares han sido frecuentemente utilizados para estudiar e intentar comprender su estructura genómica. D'Hont *et al.* (1998) realizando un análisis de hibridación *in situ* de dos familias génicas de ARN ribosomal, determinaron que *S. officinarum* tiene un número cromosómico básico de $x=10$, lo que significa que estas plantas son octoploides. También demostraron que *S. spontaneum* tiene un número cromosómico básico de $x=8$ y que la ploidía de esta especie varía entre 5 y 16.

1.11.2 Marcadores para selección asistida e identificación varietal

Wu *et al.* (1992) describieron una metodología para identificar marcadores que pudieran estar asociados a una característica de carácter monogénico. Para esto debe realizarse una cruce en la cual se asume, que la característica, -resistencia a una enfermedad por ejemplo-, se expresa en uno de los progenitores por la presencia de solamente un alelo dominante y los demás recesivos. Siendo este el caso, la producción de sus gametos se realizaría en proporciones $\frac{1}{2}$ *Aaaa* y $\frac{1}{2}$ *aaaa*. En el otro progenitor -fenotípicamente susceptible-, se asume que el alelo dominante no está presente. De esta forma, su formación de gametos sería toda *aaaa*. Se esperaría que la descendencia de esta cruce sea una población que muestra $\frac{1}{2}$ de individuos fenotípicamente resistentes y $\frac{1}{2}$ de individuos fenotípicamente susceptibles si efectivamente, la característica está controlada por un alelo dominante.

Otro razonamiento que se incluye en esta metodología establece el cruzamiento de dos individuos de igual fenotipo –resistente por ejemplo-, o su equivalente, una autofecundación. Se asume, igual que en el caso anterior, que la característica está controlada por la presencia de sólo un alelo dominante y los demás recesivos. De ser correcta esta suposición, se esperaría que la progenie muestre $\frac{3}{4}$ de la población resistente y $\frac{1}{4}$ susceptible.

Hasta ahora, solamente ha sido reportado un marcador monogénico asociado a un fenotipo específico, desarrollado por Le Cunff *et al.* (2008), este es un marcador basado en PCR, que está asociado con un alelo de resistencia a la enfermedad conocida como roya marrón, causada por el hongo *Puccinia melanocephala*.

El desarrollo de la electrónica ha facilitado avances en la genómica estructural y funcional. En caña de azúcar ya se ha comenzado a utilizar la tecnología de “arrays” para identificar marcadores (Heller-Uszynska, *et al.*, 2010). También ha demostrado ser una poderosa herramienta para la identificación de genes asociados a procesos o características particulares. Carson *et al.* (2002) demostraron que es posible la identificación de genes, mediante una estrategia que combina hibridación sustractiva y macroarrays de ADN complementario (cDNA).

1. Introducción

El genotipado de variedades, también conocido como fingerprinting, es otra de las aplicaciones de los marcadores moleculares que ha mostrado beneficios en caña de azúcar. La generación de marcadores basados en PCR ha facilitado identificar marcadores polimórficos, con los cuales es posible generar patrones genéticos únicos para cada variedad de interés. Esto ha venido a facilitar el proceso de control de calidad en la producción y multiplicación de semilla vegetativa (Cengicaña, 2012).

Las aplicaciones que se realizan con los marcadores moleculares en el cultivo de caña de azúcar, han mostrado ser útiles en situaciones particulares como las mencionadas anteriormente. Sin embargo, aún existe una brecha que no ha podido ser cubierta, debido a que no se han podido generar marcadores en suficiente número que permita el análisis del genoma completo y el consecuente aprovechamiento de esta información.

1.11.3 Marcadores moleculares para el análisis de la diversidad genética

La determinación de la diversidad genética entre cultivares es potencialmente una herramienta importante para propósitos de fitomejoramiento, puesto que puede proveer a los fitomejoradores con los medios para analizar la variación disponible en colecciones de germoplasma. Esta diversidad da a los mejoradores de caña de azúcar la oportunidad de seleccionar germoplasma más diverso para incluir dentro de sus programas de mejoramiento (Aitken y McNeil, 2010).

El análisis de los patrones moleculares permite establecer el grado de similitud entre las variedades, lo que permite visualizar los niveles de diversidad genética con que se cuenta en las colecciones y en los programas de mejoramiento (Aitken y McNeil, 2010). El análisis de marcadores moleculares ofrece una medida de las relaciones genéticas con base en características del ADN (Singh *et al.*, 2010). Esa información se convierte en una herramienta para la planificación de las hibridaciones.

Para datos de marcadores moleculares, se calculan las frecuencias alélicas y se usan para construir una matriz binaria para análisis estadístico. Las medidas de distancia o similitud genética más comúnmente utilizadas con datos binarios para calcular la diversidad genética son el coeficiente de Nei y Li y el coeficiente

1. Introducción

de Jaccard. Alternativamente, técnicas de análisis multivariado, las cuales analizan simultáneamente múltiples mediciones en cada individuo bajo investigación se utilizan ampliamente para el análisis de la diversidad genética, indistintamente del conjunto de datos (morfológicos, bioquímicos o moleculares). Dentro de estos algoritmos, el análisis de conglomerados que utiliza el método jerárquico aglomerativo UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages por sus siglas en inglés), el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de coordenadas principales son, actualmente, los más comúnmente utilizados y particularmente útiles (Aitken y McNeil, 2010).

En el año 2005, el programa de mejoramiento genético de caña de azúcar en Guatemala realizó una primera caracterización de germoplasma mediante microsatélites (Quemé, Molina, Melgar, 2005) y actualmente, su uso aporta información a la planificación de las cruas.

Maccheroni *et al.* (2007) reportaron la utilización de tres marcadores microsatélite derivados del análisis de secuencias EST para discriminar variedades de caña de azúcar, identificar accesiones duplicadas en el banco de germoplasma, determinar índices de similitud entre variedades que ayude a seleccionar progenitores para cruzamientos, e identificación de progenitores masculinos en policruas. Por otra parte, con base en la secuenciación de clones de dos bibliotecas genómicas, Parida *et al.* (2008) reportaron el desarrollo de 1.315 marcadores microsatélite a los que denominaron SEGMS (Sugarcane Enriched Genomic MicroSatellite).

1.11.4 Marcadores moleculares para diagnóstico de patógenos

Debido a su alta sensibilidad, los métodos de diagnóstico moleculares son capaces de detectar patógenos aún en plantas asintomáticas, con alícuotas extremadamente bajas del patógeno. Se han desarrollado evaluaciones moleculares para enfermedades como el raquitismo de las socas, la enfermedad de Fiji, mosaico y síndrome del amarillamiento foliar, entre otras (Lackshmanan *et al.*, 2005).

1. Introducción

Girard *et al.* (2010) reportan la utilización de un par de iniciadores no específicos para la detección del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, cuyo producto de amplificación es de 219 pb. También utilizaron tres pares de iniciadores específicos para la identificación de tres diferentes genotipos, BRA-PER, CUB y REU, cuyos productos de amplificación son de 362, 450 y 905 pb respectivamente.

Para la detección de la bacteria *Xanthomonas albilineans*, causante de la enfermedad conocida como escaldadura foliar, Davis, Rott y Astua-Monge (1998) desarrollaron una metodología basada en la técnica de PCR anidado, mediante la cual, la presencia del patógeno se manifiesta mediante la amplificación inicial de un fragmento de 440 pb y de 308 pb en la segunda amplificación.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de la agroindustria azucarera guatemalteca, mediante el uso de la biotecnología en el proceso de selección y mejora genética de la caña de azúcar utilizando distintas técnicas biotecnológicas que nos permitan el análisis de la variabilidad, nos faciliten la selección de materiales y nos permitan la obtención de híbridos más productivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar y selección de materiales de interés utilizando marcadores moleculares.
 - 1.1 Estudio de la variabilidad en variedades de caña de azúcar utilizando marcadores tipo microsatélite.
 - 1.2 Identificación de materiales de interés portadores del alelo *Bru1* asociado con la resistencia a la enfermedad de la roya marrón y análisis de correlación genotipo-fenotipo.
2. Obtención de híbridos de interés en la mejora genética de caña de azúcar e identificación cruzas superiores mediante evaluación de familias F₁.
3. Diagnóstico de materiales infectados con *Xanthomonas albilineans*, y virus del Amarillamiento, caracterización de cepas y desarrollo de metodologías de saneamiento de material infectado.
4. Desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* para la conservación y propagación de material saneado. Evaluación de distintos factores para la inducción de la regeneración a partir de explantes de hoja en genotipos de interés.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar y selección de materiales de interés utilizando marcadores moleculares.

3.1.1 Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar utilizando marcadores tipo microsatélite

Material vegetal

En este estudio se utilizaron 204 variedades de caña de azúcar (Cuadro 4), provenientes de la Colección de Germoplasma de CENGICAÑA.

Cuadro 4. Nombre y procedencia de los genotipos caracterizados mediante marcadores microsatélite

No.	Variedad*	Origen	No.	Variedad	Origen
1	Akoki	EUA	26	CP00-1071	Canal Point (EUA)
2	B4744	Barbados	27	CP00-1100	Canal Point (EUA)
3	B73375	Barbados	28	CP00-1101	Canal Point (EUA)
4	BA11569	Barbados	29	CP00-1359	Canal Point (EUA)
5	BJ5732	Barbados	30	CP00-1570	Canal Point (EUA)
6	CB40-35	Campus (Brasil)	31	CP00-1607	Canal Point (EUA)
7	CC85-92	Cengicaña (Colombia)	32	CP00-1675	Canal Point (EUA)
8	CG00-033	Cengicaña (Guatemala)	33	CP00-1683	Canal Point (EUA)
9	CG00-102	Cengicaña (Guatemala)	34	CP00-1748	Canal Point (EUA)
10	CG00-111	Cengicaña (Guatemala)	35	CP00-1749	Canal Point (EUA)
11	CG00-129	Cengicaña (Guatemala)	36	CP00-1751	Canal Point (EUA)
12	CG01-27	Cengicaña (Guatemala)	37	CP00-1758	Canal Point (EUA)
13	CG01-53	Cengicaña (Guatemala)	38	CP00-1763	Canal Point (EUA)
14	CG01-60	Cengicaña (Guatemala)	39	CP00-1803	Canal Point (EUA)
15	CG02-163	Cengicaña (Guatemala)	40	CP00-1810	Canal Point (EUA)
16	CG03-025	Cengicaña (Guatemala)	41	CP00-1825	Canal Point (EUA)
17	CG03-114	Cengicaña (Guatemala)	42	CP00-1830	Canal Point (EUA)
18	CG03-240	Cengicaña (Guatemala)	43	CP00-2164	Canal Point (EUA)
19	CG03-242	Cengicaña (Guatemala)	44	CP00-2180	Canal Point (EUA)
20	CG97-97	Cengicaña (Guatemala)	45	CP00-7753	Canal Point (EUA)
21	CG98-10	Cengicaña (Guatemala)	46	CP01-1262	Canal Point (EUA)
22	CG98-46	Cengicaña (Guatemala)	47	CP01-1338	Canal Point (EUA)
23	CG98-78	Cengicaña (Guatemala)	48	CP01-1372	Canal Point (EUA)
24	CG99-099	Cengicaña (Guatemala)	49	CP01-1449	Canal Point (EUA)
25	Co421	Coimbatore (India)	50	CP01-1614	Canal Point (EUA)

*De manera general, las variedades de caña de azúcar se nombran con las iniciales de su origen geográfico, seguido por dos números separados por un guión, el primero de ellos indica el año en que esa variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección.

3. Materiales y métodos

...Continuación Cuadro 4

No.	Variedad*	Origen	No.	Variedad	Origen
51	CP01-1750	Canal Point (EUA)	96	CP53-6	Canal Point (EUA)
52	CP01-1779	Canal Point (EUA)	97	CP66-346	Canal Point (EUA)
53	CP01-1802	Canal Point (EUA)	98	CP67-42	Canal Point (EUA)
54	CP01-2471	Canal Point (EUA)	99	CP70-321	Canal Point (EUA)
55	CP01-2634	Canal Point (EUA)	100	CP72-2086	Canal Point (EUA)
56	CP02-1003	Canal Point (EUA)	101	CP73-1547	Canal Point (EUA)
57	CP02-1049	Canal Point (EUA)	102	CP75-1082	Canal Point (EUA)
58	CP02-1050	Canal Point (EUA)	103	CP75-1553	Canal Point (EUA)
59	CP02-1120	Canal Point (EUA)	104	CP75-1632	Canal Point (EUA)
60	CP02-1124	Canal Point (EUA)	105	CP76-328	Canal Point (EUA)
61	CP02-1255	Canal Point (EUA)	106	CP77-1055	Canal Point (EUA)
62	CP02-1345	Canal Point (EUA)	107	CP78-1247	Canal Point (EUA)
63	CP02-1593	Canal Point (EUA)	108	CP78-1628	Canal Point (EUA)
64	CP02-1668	Canal Point (EUA)	109	CP79-332	Canal Point (EUA)
65	CP02-1703	Canal Point (EUA)	110	CP80-1743	Canal Point (EUA)
66	CP02-1756	Canal Point (EUA)	111	CP80-1752	Canal Point (EUA)
67	CP02-1769	Canal Point (EUA)	112	CP80-1827	Canal Point (EUA)
68	CP02-1784	Canal Point (EUA)	113	CP81-1335	Canal Point (EUA)
69	CP02-1807	Canal Point (EUA)	114	CP81-1383	Canal Point (EUA)
70	CP02-1840	Canal Point (EUA)	115	CP82-2043	Canal Point (EUA)
71	CP02-1915	Canal Point (EUA)	116	CP85-1482	Canal Point (EUA)
72	CP02-1966	Canal Point (EUA)	117	CP86-1209	Canal Point (EUA)
73	CP02-1969	Canal Point (EUA)	118	CP86-1614	Canal Point (EUA)
74	CP02-2113	Canal Point (EUA)	119	CP86-1623	Canal Point (EUA)
75	CP02-2584	Canal Point (EUA)	120	CP86-1633	Canal Point (EUA)
76	CP03-1002	Canal Point (EUA)	121	CP86-1664	Canal Point (EUA)
77	CP03-1103	Canal Point (EUA)	122	CP86-1705	Canal Point (EUA)
78	CP03-1494	Canal Point (EUA)	123	CP86-1747	Canal Point (EUA)
79	CP03-1553	Canal Point (EUA)	124	CP86-2024	Canal Point (EUA)
80	CP03-1585	Canal Point (EUA)	125	CP87-1141	Canal Point (EUA)
81	CP03-1594	Canal Point (EUA)	126	CP87-1500	Canal Point (EUA)
82	CP03-1646	Canal Point (EUA)	127	CP88-1165	Canal Point (EUA)
83	CP03-1660	Canal Point (EUA)	128	CP88-1179	Canal Point (EUA)
84	CP03-1688	Canal Point (EUA)	129	CP88-1532	Canal Point (EUA)
85	CP03-1724	Canal Point (EUA)	130	CP88-1696	Canal Point (EUA)
86	CP03-2212	Canal Point (EUA)	131	CP88-1700	Canal Point (EUA)
87	CP04-1067	Canal Point (EUA)	132	CP88-1726	Canal Point (EUA)
88	CP04-119	Canal Point (EUA)	133	CP88-1912	Canal Point (EUA)
89	CP04-1510	Canal Point (EUA)	134	CP88-2017	Canal Point (EUA)
90	CP04-2076	Canal Point (EUA)	135	CP89-1288	Canal Point (EUA)
91	CP04-2115	Canal Point (EUA)	136	CP89-1325	Canal Point (EUA)
92	CP27-139	Canal Point (EUA)	137	CP89-1327	Canal Point (EUA)
93	CP29-126	Canal Point (EUA)	138	CP89-1344	Canal Point (EUA)
94	CP48-103	Canal Point (EUA)	139	CP89-1417	Canal Point (EUA)
95	CP52-43	Canal Point (EUA)	140	CP89-1431	Canal Point (EUA)

*De manera general, las variedades de caña de azúcar se nombran con las iniciales de su origen geográfico, seguido por dos números separados por un guión, el primero de ellos indica el año en que esa variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección.

...Continuación Cuadro 4.

No.	Variiedad*	Origen	No.	Variiedad	Origen
141	CP89-1436	Canal Point (EUA)	173	CPCL02-2584	Canal Point-Clewiston (EUA)
142	CP89-1528	Canal Point (EUA)	174	CPCL05-1504	Canal Point-Clewiston (EUA)
143	CP89-1538	Canal Point (EUA)	175	HoCP02-639	Houma-Canal Point (EUA)
144	CP89-1551	Canal Point (EUA)	176	L77-40	Luisiana (EUA)
145	CP89-1606	Canal Point (EUA)	177	Mex53-142	Mexico
146	CP89-1632	Canal Point (EUA)	178	Mex58-326	Mexico
147	CP89-2143	Canal Point (EUA)	179	Mex60-445	Mexico
148	CP90-1204	Canal Point (EUA)	180	Mex60-676	Mexico
149	CP90-1222	Canal Point (EUA)	181	Mex68-2243	Mexico
150	CP90-1294	Canal Point (EUA)	182	Mex73-523	Mexico
151	CP91-1450	Canal Point (EUA)	183	Mex75-1705	Mexico
152	CP91-1560	Canal Point (EUA)	184	Mex79-431	Mexico
153	CP91-1564	Canal Point (EUA)	185	NA56-75	Norte de Argentina
154	CP91-1941	Canal Point (EUA)	186	POJ2714	Proefstation Oost Java (Indonesia)
155	CP91-2087	Canal Point (EUA)	187	POJ2878	Proefstation Oost Java (Indonesia)
156	CP92-1185	Canal Point (EUA)	188	PR71-358	Puerto Rico
157	CP92-1682	Canal Point (EUA)	189	PR77-3031	Puerto Rico
158	CP92-1780	Canal Point (EUA)	190	PR83-2046	Puerto Rico
159	CP93-1056	Canal Point (EUA)	191	PR87-2004	Puerto Rico
160	CP94-1182	Canal Point (EUA)	192	PR87-2015	Puerto Rico
161	CP96-1068	Canal Point (EUA)	193	PR87-3025	Puerto Rico
162	CP96-1093	Canal Point (EUA)	194	PR99-7	Puerto Rico
163	CP96-1120	Canal Point (EUA)	195	Q124	Queensland (Australia)
164	CP96-1552	Canal Point (EUA)	196	R570	Reunion
165	CP97-1931	Canal Point (EUA)	197	RB845210	República de Brasil
166	CP98-1029	Canal Point (EUA)	198	San Felipe	Origen desconocido
167	CP99-1944	Canal Point (EUA)	199	SP70-4768	Sao Paulo (Brasil)
168	CP99-1989	Canal Point (EUA)	200	SP71-6161	Sao Paulo (Brasil)
169	CPCL00-6131	Canal Point-Clewiston (EUA)	201	SP79-1287	Sao Paulo (Brasil)
170	CPCL02-0878	Canal Point-Clewiston (EUA)	202	SP79-2233	Sao Paulo (Brasil)
171	CPCL02-1546	Canal Point-Clewiston (EUA)	203	SP80-1842	Sao Paulo (Brasil)
172	CPCL02-2186	Canal Point-Clewiston (EUA)	204	SP81-3250	Sao Paulo (Brasil)

*De manera general, las variedades de caña de azúcar se nombran con las iniciales de su origen geográfico, seguido por dos números separados por un guión, el primero de ellos indica el año en que esa variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección.

En este trabajo se incluyeron 7 variedades en duplicado que se utilizaron para verificar la uniformidad en el proceso de amplificación, electroforesis y tinción de bandas. Se esperaba que en el análisis de similitud estas variedades agruparan por pares con sus duplicados con un coeficiente de similitud igual a 1. Las variedades control fueron: CP72-2086, CP00-1607, CP00-1071, CP00-1100, CP00-2180, CP00-1570 y CP73-1547.

Extracción de ADN

El procedimiento utilizado para la extracción de ADN se basó en el trabajo de Hoisington *et al.*, (1994) con algunas modificaciones menores. Se tomaron aproximadamente 150 mg de material vegetal y se maceraron con Nitrógeno líquido dentro de un tubo de 2,5 ml, al que se le agregó 600 µl de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) precalentado a 65°C y se dejó en baño de María a 65°C durante 30 minutos mezclando ocasionalmente, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se agregaron 500 µl de una solución de cloroformo:alcoholisoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó a un tubo nuevo en donde se le agregaron 15 µl de ARNasa (10 mg/ml) y se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente, se repitió el lavado con cloroformo:alcohol isoamílico y se recuperó nuevamente el sobrenadante. Por último se agregaron 2,5 volúmenes de isopropanol frío y 1/10 de acetato de amonio para precipitar los ácidos nucleicos, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos hasta formar un pellet que posteriormente se lavó con alcohol etílico al 70 % y se dejó secar sobre la mesa, una vez seco se resuspendió en 100 µl de agua para PCR y se almacenó a 4°C.

Cuantificación del ADN extraído

De cada muestra se tomaron 5 µl del ADN extraído y se diluyeron en 2,995 µl de agua ultrapura. Utilizando una cubeta de cuarzo, a esta dilución se le midió la absorbancia de luz a 260 nm y 280 nm de longitud de onda y para calcular la concentración de ADN se utilizó la siguiente relación:

$$\mu\text{g/ml ADN} = (\text{abs}_{260} \text{ medida}) * (50\mu\text{g/ml}) * (\text{factor de dilución})$$

La pureza de la solución de ADN se determinó obteniendo la razón de absorbancia 260 nm/280 nm. Se consideró adecuada la pureza de la solución cuando esta razón estuvo en el rango entre 1,7 y 1,9.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron tres pares de iniciadores (Cuadro 5) reportados por Maccheroni *et al.* (2007) que amplifican secuencias microsatélite.

Cuadro 5. Identificación y características de los iniciadores utilizados.

Identificación	Secuencia	Rango de amplificación (bp)	Motivo	Temperatura Anillamiento (°C)
CV29r	5'-GCG TGC ATC GCT TGT GTC TT -3'	85-151	(ATCT)	64
CV29f	5'-TCG CGT CCA CCA ATG TAA CC -3'			
CV37r	5'-ATA AAG TGG CCG CTT GGA TTG A -3'	114-171	(TTTC)	
CV37f	5'-GGA TGG ACG ACG TGT CCT GG -3'			
CV38r	5'-GTC AAA CAG GCG ATC TGG CTC-3'	93-238	(CTTTT)	
CV38f	5'-GAA GCA GGG GCC TCA AGT TG- 3'			

Fuente: Maccheroni *et al.* (2007)

El volumen total de la reacción fue de 10 µl. Se utilizaron 8,6 µl de Master Mix Amplitaq Gold 360 de Applied Biosystems, 0,2 µl de cada iniciador a una concentración de 10,0 µM y 1 µl de ADN (25 ng).

Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción

La electroforesis se realizó en una cámara MiniProtean TetraCell (Bio-Rad) y los geles se prepararon con una mezcla de acilamida:bisacrilamida 37,5:1 (40 %), TBE 5X, agua destilada, temed y APS. Las cámaras se llenaron con TBE1X y se aplicaron 110 voltios durante 90 minutos.

Los geles de poliacrilamida se separaron de los vidrios tras la electroforesis y, la tinción de las bandas de ADN se realizó de la siguiente manera: fijación por 20 minutos con ácido acético 10 %, tres lavados de 2 minutos con agua destilada, tinción con nitrato de plata (AgNO₃ 0,1 % p/v, formaldehído 0,15 % v/v) durante 30 minutos, un lavado con agua destilada de 10 segundos, revelado con una solución fría de carbonato de sodio (NaCO₃ 3 % p/v, formaldehído 0,15 %, tiosulfato de sodio 0,00052 %) hasta la aparición de bandas definidas y, finalmente, la detención de la reacción de revelado con ácido acético al 10 %.

Análisis de los datos

Los datos de presencia/ausencia de bandas fueron utilizados para cuantificar la similitud genética utilizando el coeficiente de Dice ($S_{a,b}$).

$$S_{a,b} = 2N / (2N + n_a + n_b)$$

Donde $S_{a,b}$ es el coeficiente de la similitud que existe entre los genotipos a y b ; N es el total de coincidencia positiva entre los genotipos a y b ; n_a y n_b son el total de bandas no coincidentes presentes en cada genotipo a y b , respectivamente (Harvey and Botha, 1996). Los resultados del coeficiente de Dice fueron utilizados para generar una matriz de similitud, la cual fue interpretada gráficamente a través del método de agrupamiento UPGMA, utilizando el software NTSYSpc (Rohlf, 2003).

3.1.2 Identificación de materiales de interés portadores del alelo *Bru1* asociado con la resistencia a la enfermedad de la roya marrón y análisis de correlación genotipo-fenotipo.

Material vegetal

Considerando el interés que en su momento tenían estas variedades para su utilización en cruzamientos, se analizaron 303 variedades (Cuadro 6) de un total de 2.265 que constan en la colección de germoplasma de CENGICAÑA.

Extracción y cuantificación del ADN

Se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.1.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron los iniciadores reportados por Costet *et al.* (2012) para la amplificación del marcador R12H16. Las secuencias de los oligonucleótidos son las siguientes: CTACGATGAACTACACCTTGTC (Fw) / CTTATGTTAGCGTGACCTATGGTC (Rv). El fragmento que amplifican aquellas variedades que portan el alelo de resistencia *Bru1*, se corresponde a una banda de 570 pb.

El volumen total de la PCR fue de 25 μ l. Para dicha reacción se utilizaron 11 μ l del Master Mix Amplitaq Gold 360 de Applied Biosystems, 2 μ l de cada iniciador a 10 μ M y 10 μ l de ADN (25 ng/ μ l).

Cuadro 6. Listado de variedades utilizadas para la identificación genotípica del alelo *Bru1*.

No.	Variedad	No.	Variedad	No.	Variedad	No.	Variedad	No.	Variedad	No.	Variedad
1	B47258	52	CPCL02-0878	103	CG03-104	154	CP02-1334	205	CP86-1747	256	Mex68-2243
2	B4744	53	CPCL02-2584	104	CG03-114	155	CP02-1345	206	CP86-2024	257	My5464
3	B73375	54	Ja64-20	105	CG03-138	156	CP02-1593	207	CP87-1141	258	NA56-42
4	BA11569	55	Mex57-29	106	CG03-240	157	CP02-1703	208	CP87-1500	259	NA56-75
5	BJ5732	56	Mex57-473	107	CG03-242	158	CP02-1784	209	CP88-1165	260	P33-11
6	CB40-35	57	Mex60-445	108	CG03-256	159	CP02-1807	210	CP88-1179	261	PGM89-121
7	CG00-033	58	Mex69-290	109	CG95-107	160	CP02-1966	211	CP88-1532	262	POJ2878
8	CG02-064	59	Mex73-523	110	CG96-40	161	CP02-1969	212	CP88-1696	263	PPQK
9	CG02-064	60	Mex75-1705	111	CG96-78	162	CP02-2584	213	CP88-1700	264	PR61-632
10	CG03-025	61	Mex79-431	112	CG98-10	163	CP03-1002	214	CP88-1726	265	PR71-358
11	CG05-07344	62	Mex82-114	113	CG98-100	164	CP03-1494	215	CP88-1912	266	PR75-2002
12	CG99-099	63	PGM89-968	114	CG98-32	165	CP03-1553	216	CP88-2017	267	PR77-3031
13	CGCP95-53	64	POJ2714	115	CG98-46	166	CP03-1585	217	CP89-1288	268	PR78-3025
14	Co421	65	PR78-3012	116	CG98-62	167	CP03-1594	218	CP89-1325	269	PR87-2073
15	Co997	66	PR83-2046	117	CG98-78	168	CP03-1660	219	CP89-1327	270	PR87-2078
16	CP00-1570	67	PR87-2004	118	CG99-045	169	CP03-2212	220	CP89-1344	271	PR87-2080
17	CP00-1607	68	PR87-2015	119	CG99-048	170	CP04-1067	221	CP89-1417	272	Q107
18	CP00-1610	69	PR87-3025	120	CG99-087	171	CP04-119	222	CP89-1431	273	Q124
19	CP00-1830	70	PR99-7	121	CG99-125	172	CP04-1510	223	CP89-1436	274	Q96
20	CP00-2180	71	R570	122	CGCP95-50	173	CP04-2076	224	CP89-1528	275	RB73-2908
21	CP00-7753	72	RB732577	123	CGSP98-11	174	CP27-139	225	CP89-1538	276	SP71-6180
22	CP01-1338	73	RB845210	124	CGSP98-12	175	CP29-126	226	CP89-1551	277	SP79-1287
23	CP01-1614	74	RD75-11	125	CGSP98-16	176	CP48-103	227	CP89-1606	278	SP80-1842
24	CP01-1779	75	San Felipe	126	CL61-620	177	CP52-43	228	CP89-1632	279	SP81-3250
25	CP01-1802	76	SP70-4768	127	Co270	178	CP53-6	229	CP90-1204	280	SP83-2847
26	CP02-1668	77	SP79-2233	128	CP00-1071	179	CP63-588	230	CP90-1222	281	Tuc68-19
27	CP02-1756	78	Akoki	129	CP00-1100	180	CP65-357	231	CP90-1294	282	UCW5407
28	CP02-1769	79	B74-132	130	CP00-1101	181	CP67-42	232	CP91-1450	283	CG03-292
29	CP02-1840	80	C116-67	131	CP00-1359	182	CP70-321	233	CP91-1560	284	CG95-125
30	CP02-1915	81	C87-51	132	CP00-1675	183	CP72-1210	234	CP91-1564	285	CG96-01
31	CP02-2113	82	CB46-47	133	CP00-1683	184	CP72-1312	235	CP91-1941	286	CG96-135
32	CP03-1103	83	CC82-15	134	CP00-1748	185	CP73-1547	236	CP92-1185	287	CG96-42
33	CP03-1646	84	CC85-92	135	CP00-1749	186	CP75-1082	237	CP92-1682	288	CG96-52
34	CP03-1688	85	CG00-032	136	CP00-1751	187	CP75-1553	238	CP92-1780	289	CG97-100
35	CP03-1724	86	CG00-043	137	CP00-1758	188	CP76-328	239	CP93-1056	290	CG97-97
36	CP04-2115	87	CG00-092	138	CP00-1763	189	CP77-1055	240	CP96-1093	291	CG98-47
37	CP56-59	88	CG00-102	139	CP00-1803	190	CP78-1628	241	CP96-1552	292	CG99-007
38	CP62-374	89	CG00-111	140	CP00-1810	191	CP79-332	242	CP99-1989	293	CG99-023
39	CP66-346	90	CG00-120	141	CP00-1825	192	CP80-1743	243	CPCL02-1546	294	CGSP98-05
40	CP72-2086	91	CG00-129	142	CP00-2164	193	CP80-1752	244	CPCL02-2186	295	CGSP98-09
41	CP75-1632	92	CG01-17	143	CP01-1262	194	CP80-1827	245	CPCL05-1504	296	CP02-1003
42	CP78-1247	93	CG01-27	144	CP01-1372	195	CP81-1335	246	HoCP02-639	297	CP57-603
43	CP88-1508	94	CG01-52	145	CP01-1449	196	CP81-1383	247	IJ76-521	298	CP91-2087
44	CP89-2143	95	CG01-53	146	CP01-1750	197	CP82-2043	248	Ja64-19	299	Mex60-676
45	CP94-1182	96	CG01-60	147	CP01-2471	198	CP85-1482	249	L68-40	300	PR67-1355
46	CP96-1068	97	CG01-87	148	CP01-2634	199	CP86-1209	250	L77-40	301	PR87-2048
47	CP96-1120	98	CG02-007	149	CP02-1049	200	CP86-1614	251	L80-38	302	RB72-1012
48	CP97-1931	99	CG02-144	150	CP02-1050	201	CP86-1623	252	LM2002	303	SP71-6161
49	CP98-1029	100	CG02-163	151	CP02-1120	202	CP86-1633	253	Mex53-142		
50	CP99-1944	101	CG03-047	152	CP02-1124	203	CP86-1664	254	Mex57-683		
51	CPCL00-6131	102	CG03-098	153	CP02-1255	204	CP86-1705	255	Mex58-326		

Electroforesis y tinción

La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,5 % y se le aplicaron 90 voltios durante 90 minutos. Para teñir los geles de agarosa se agregó 1 µl de GelRed™ (Biotium) por cada 40 ml de agarosa y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Comparación de datos moleculares con datos fenotípicos

La información obtenida tras la amplificación o no del fragmento de 570 pb que se corresponde con presencia o ausencia del alelo *Bru1* se comparó con la información disponible relativa al comportamiento frente a la enfermedad en evaluaciones fenotípicas realizadas con las mismas variedades durante los años 2008, 2011, 2012 y 2013 en dos localidades: Estación Experimental Camantulul y Finca Los Tarros.

Evaluación fenotípica

En estas evaluaciones, la incidencia y severidad de la enfermedad se evaluó a los seis meses de desarrollo de las plantas, utilizando la escala de Purdy y Dean, (1981), evaluando la tercera hoja con cuello visible (Figura 6). Siguiendo los criterios de Acosta *et al.* (2012), las variedades con reacción (R) ≤ 5 e incidencia (I) hasta el 12 % fueron consideradas resistentes, mientras que aquellas con (R) > 5 e incidencia mayor de 12 % fueron consideradas susceptibles.

3. Materiales y métodos

Escala para la calificación de resistencia de la caña de azúcar a las royas

Reacción	Descripción según el tipo de pústula	Calificación
0	Infección no visible. Roya presente en la zona geográfica.	Resistente
1	Pequeñas rayas cloróticas solamente.	
2	Rayas necróticas solamente.	
3	Manchas pequeñas a grandes, de forma irregular, rojas a cafés; pueden estar fusionadas entre sí. Ausencia de pústulas.	
4	Manchas individuales cloróticas o rojas, con pústulas sin abrir.	
5	Manchas individuales cloróticas o rojas, con pústulas abiertas y produciendo esporas.	Susceptible
6	Manchas grandes en la hoja, enrojecidas o necróticas, con pústulas produciendo esporas.	
7	Manchas rojas o cafés, fusionadas, que cubren gran parte de la lámina foliar de un borde a otro y atraviesan la nervadura central, con pústulas esporulantes.	
8	Las pústulas en tejido clorótico esporulando activamente.	
9	Las pústulas con tejido verde esporulando activamente.	

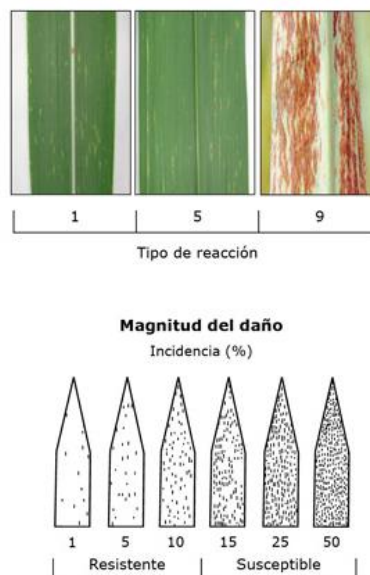


Figura 6. Escala de Purdy y Dean (1981) para la evaluación de resistencia de la caña de azúcar a la roya marrón y roya naranja. Fuente: Ángel *et al.*, (2010)

3.2 Obtención de híbridos de interés en la mejora genética de caña de azúcar.

Identificación de cruza superiores mediante evaluación de familias F₁

Los cruzamientos realizados entre distintas variedades cuyos genotipos se seleccionaron tomando en cuenta los análisis de variabilidad y resistencia a la roya marrón, se muestran el Cuadro 7. En 2012 se realizaron ocho cruza, las planta obtenidas de una cruza constituyen una familia y estas familias fueron evaluadas durante 2013-2014 (plantía y primera soca), mientras que en 2013 se realizaron 14 cruza cuyas familias fueron evaluadas durante 2014-2015. La evaluación de familias tiene el objetivo de identificar cruza y progenitores que produzcan progenies agrónomicamente superiores para darle énfasis a la selección de materiales provenientes de ellas y se realiza con una muestra de la semilla total obtenida en la cruza, que es lo que se ha llevado a cabo en el marco de esta tesis.

El programa continuará con la siembra del resto de la semilla obtenida en los cruzamientos. Cada semilla de cada cruza es un genotipo único que dará origen a una planta (F₁) en plantía. Esta planta emitirá brotes desde la base y producirá una macolla (conjunto de tallos y hojas que nacen de un mismo pie) que tras cortar tallos en la primera anualidad rebrotará (primera soca) y es aquí en donde

se hace la primera selección con base en planta individual. La plantía y primera soca de estas plantas es lo que llamamos Estado I de selección. Los tallos de las plantas seleccionadas se cortan en secciones de aproximadamente 40 cm de longitud (con tres yemas) y estos esquejes servirán como semilla vegetativa para la siguiente siembra. La cantidad de esquejes de cada panta seleccionada se divide en dos partes y se siembra en dos localidades diferentes donde se evaluarán durante un año en el tercer año del proceso (Estado II de selección). Aquí ya se siembra un surco de 5 m con los esquejes de la planta F₁ original, todas las plantas de este surco son clones de la planta F₁ original. De aquí en adelante se repite el proceso con el Estado III de selección que dura 2 años y con los Estados IV y V que duran 3 años cada uno (todos los clones siguen siendo F₁), en total 12 años incluyendo el año de las cruzas.

Cuadro 7. Listado de cruzamientos realizados durante 2012 y 2013 con base en información obtenida de caracterización molecular

Cruzas 2012			Cruzas 2013		
No. Cruza	Progenitor femenino	Progenitor masculino	No. Cruza	Progenitor femenino	Progenitor masculino
1	CP73-1547	CP00-1359	1	CP00-1675	CC85-92
2	CP73-1547	SP79-2233*	2	CP97-1931*	CG03-025*
3	CP73-1547	CG98-46	3	CP97-1931*	CC85-92
4	CP02-1807	CP00-2164	4	CP52-43	CG03-025*
5	CP02-1807	CP01-2471	5	CP73-1547	Mex79-431*
6	PR87-2015*	CP86-2024	6	CP73-1547	CC85-92
7	CP89-2143*	CC85-92	7	CP73-1547	CG03-025*
8	CP89-2143*	CP72-2086*	8	CPCL02-1546	CG98-78
			9	CG00-102	CP80-1743
			10	CP00-1830*	CG98-78
			11	CPCL02-0878*	CP00-1570*
			12	CG98-10	CC85-92
			13	CP72-2086*	CG98-46
			14	CP72-2086*	CG98-78

*Amplificó el alelo *Bru1* de resistencia a Roya Marrón

Las semillas obtenidas fueron sembradas en bandejas con sustrato Sunshine Growing Mix No. 5 (Sun Gro Horticulture) bajo condiciones de invernadero en la Estación Experimental Camantulul y tres meses después se trasplantaron al campo en la misma Estación. Se sembraron 32 plantas de cada crusa y se utilizaron para hacer la evaluación de familias. En esta evaluación se registraron

datos de Brix utilizando refractómetro que nos indica el porcentaje de sólidos solubles que hay en la muestra, la altura de planta (m), diámetro de tallo (cm), número de tallos/10 m e incidencia de enfermedades (síntomas típicos asociados a carbón, escaldadura, virus del mosaico, roya marrón, roya naranja y SCYLV). La variedad CP72-2086 fue utilizada como comparador debido a que actualmente es la variedad a superar en rendimiento de azúcar, 11,5 TM/ha en promedio, siendo la más ampliamente distribuida en la zona cañera (33,4 %). Debido a que, por el reducido número de plantas en el ensayo de familias y el hecho de que cada una es un genotipo diferente, aun no es posible medir rendimiento de azúcar, las inferencias se realizan con base en las variables arriba mencionadas. Los datos obtenidos se presentan en forma de cuadros.

3.3 Diagnóstico, caracterización y prospección de *Xanthomonas albilineans* y virus de la hoja Amarilla de la Caña de Azúcar en distintas zonas de cultivo de caña de Guatemala. Evaluación de metodologías para saneamiento de materiales infectados.

3.3.1 Obtención de tallos infectados

Se recolectaron tallos de macollas individuales que mostraban síntomas de cada enfermedad en tres diferentes localidades: San Bonifacio, El Retazo y Camantulul (Cuadro 8). En las primeras dos localidades la infección de *X. albilineans* ocurrió naturalmente y las plantas correspondían a variedades obtenidas a través de cruzamientos realizados por el Programa de Mejoramiento de Cengicaña, cuyo desempeño fue evaluado durante el período 2013-2014 y que no fueron seleccionadas debido a lo evidente de los síntomas, mientras que en la tercera localidad la infección se indujo por inoculación en plantas de dos variedades comerciales. En las plantas con síntomas de SCYLV, la infección fue natural.

3. Materiales y métodos

Cuadro 8. Número de tallos y yemas obtenidos de genotipos con síntomas visuales de *X. albilineans* y SCYLV utilizados en el diagnóstico y saneamiento de materiales infectados.

Con síntomas de <i>X. albilineans</i>					Con síntomas de SCYLV				
Genotipo	Parental femenino	Parental masculino	No. Tallos	No. Yemas	Genotipo	Parental femenino	Parental masculino	No. Tallos	No. Yemas
CG12-534025	CP89-1431	CP63-588	2	20	CP72-2086	CP62-374	CP63-588	3	29
CG12-041034	L80-3	CP78-1610	2	20	CG12-324140	CG96-01	B7306	1	13
CG12-326008	CG96-01	B74132	2	20	CG12-333045	CP72-1210	CC85-92	3	23
CG12-135046	CG00-102	Policruza	2	20	CG12-534015	CP89-1431	CP63-588	2	15
CG12-526003	CP75-1082	Eros	2	15	CG12-032028	CP02-1143	CP27-139	3	34
CG12-038024	Mex74-1409	CP77-1055	2	20	CG12-041030	L80-3	CP78-1610	3	31
CG12-135064	CG00-102	Policruza	2	20	CG12-031004	CP70-1133	Policruza	1	10
CG12-032047	CP02-1143	CP27-139	3	31	CG12-031006	CP70-1133	Policruza	1	14
CG12-639003	10P20606	B00167	2	18	CG12-534033	CP89-1431	CP63-588	2	24
CG12-318004	CB38-22	Policruza	3	28	CG12-386002	CP65-357	RB732908	1	11
CG12-638001	10P20602	BR9423	2	20	CG12-339068	CP63-588	Q96	3	28
CG12-325060	CG96-01	B74132	2	19	CG12-330001	Eros	CP75-1082	3	27
CG12-051016	CP75-1091	CP77-1055	2	29	CGB12-637001	10P20601	WI9101	1	12
CG12-011012	CP02-1143	CP77-1055	2	23	CG12-034005	CP02-1143	Policruza	1	12
CG12-523029	CP88-1508	Policruza	2	20	CG12-008022	CP62-374	CP81-1425	1	11
CG12-616020	CP91-2095	Policruza	2	20	CG12-065003	RB739331	CP02-2188	3	28
CG12-330030	Eros	CP75-1082	2	19	CG12-620006	IJ76-319	Policruza	2	20
CG12-036005	CP02-1143	CP81-1384	2	19	CG12-008022	CP62-374	CP81-1425	3	27
CG12-506002	CP70-1133	CG96-01	2	20	B7695	nd*	nd	2	21
CG12-312020	CG96-01	CP70-1133	2	12	B86513	nd	nd	2	18
CG12-051018	CP75-1091	CP77-1055	2	21	BJ7008	nd	nd	3	27
CG12-339079	CP63-588	Q96	2	15	BJ7018	nd	nd	1	13
CG12-339114	CP63-588	Q96	2	16	C1324-74	B45181	C87-51	3	26
CG12-036034	CP02-1143	CP81-1384	2	15	C266-70	Co281	POJ2878	1	13
CG12-338079	CP63-588	CP89-1431	2	17	C751-75	C389-52	My54129	2	20
CG12-035016	CP02-1143	CP78-1610	2	18	CB40-35	nd	nd	1	10
CG12-621051	CP88-1508	Policruza	2	17	CB45-3	nd	nd	4	41
CG12-135033	CG00-102	Policruza	2	17	CC85-92	Co775	Policruza	1	8
CG12-032049	CP02-1143	CP27-139	2	13	CG00-028	CG95-125	CP81-1384	4	41
CG12-014110	CP29-103	Akoki	2	19	CG00-032	CG95-125	CP81-1384	2	21
CG12-324074	CG96-01	B7306	2	17	CG00-092	PGM89-968	CG96-64	1	14
CG12-032104	CP02-1143	CP27-139	2	19	CG03-157	JA64-20	B73-06	1	13
CG12-036050	CP02-1143	CP81-1384	2	17	CG03-240	CB46-47	CP57-603	3	27
CG12-011058	CP02-1143	CP77-1055	2	18	CG03-251	CB46-47	CP57-603	1	13
CG12-312002	CG96-01	CP70-1133	2	13	CG03-277	PR87-2080	CP63-588	2	18
CP73-1547	CP66-1043	CP56-63	7	74					
CC85-92	Co775	Policruza	7	70					
		TOTAL	86	809			TOTAL	71	713

*nd= Información no disponible

Localidad San Bonifacio (color verde), El Retazo (color amarillo) y Camantulul (color azul)

Los tallos recolectados fueron identificados y trasladados al Laboratorio de Biotecnología de Cengicaña. De cada tallo obtenido se cortó un segmento de la primera hoja con cuello visible, que se utilizó para realizar la extracción de ADN genómico y ARN en el caso de las plantas con síntomas del virus. Luego, cada tallo se cortó en segmentos de 5 cm de longitud conteniendo una yema axilar

cada uno. Las yemas de cada tallo fueron asignadas aleatoriamente a los tratamientos evaluados para el saneamiento de plantas.

3.3.2 Diagnóstico de *Xanthomonas albilineans*

Para determinar la infección con la bacteria, se realizó un diagnóstico en cada tallo colectado de acuerdo con el numeral 3.3.1 antes de la aplicación de los tratamientos y en cada planta obtenida después. El diagnóstico efectuado antes de la aplicación de los tratamientos se desarrolló utilizando dos metodologías diferentes, la primera, conocida como Dot Blot Immunoabsorbent Assay (DBIA) que se basa en la reacción antígeno-anticuerpo (Davis *et al.*, 1994). La segunda metodología se basó en la reportada por Davis, Rott y Astua-Monge (1998) para la detección de *X. albilineans*, mediante el análisis por PCR. Los tallos con diagnóstico negativo por PCR fueron descartados del experimento. Esta metodología también fue utilizada en el diagnóstico de las plantas obtenidas después de la aplicación de los tratamientos para la eliminación del patógeno.

Extracción de ADN

El procedimiento utilizado para la extracción de ADN de *X. albilineans* se basó en el trabajo de Hoisington *et al.* (1994) al que se le hicieron algunas modificaciones menores. Dicho procedimiento consistió de una lisis con CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y 0,2 % de mercaptoetanol por 30 minutos a 65°C, seguido por dos limpiezas con Cloroformo:isopentanol 24:1 una incubación con ARNasa por 30 minutos, y un precipitado de ácidos nucleicos con 2,5 volúmenes de 2-propanol y de 1/10 de volumen de acetato de amonio 7,5 M. El ADN obtenido se disolvió en 100 µl de agua ultrapura.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La detección de *X. albilineans* requirió la realización de PCR anidada, es decir, de la amplificación por PCR de un primer fragmento de ADN, el cual se utiliza para amplificar un segundo fragmento de menor tamaño (Davis, Rott y Astua-Monge, 1998). El fragmento amplificado se ubica en el complejo de genes de la albicidina. Las secuencias de los iniciadores utilizados para la primera amplificación son:

directo 5'-CACACACACAATACAGCATTGCGG-3, inverso 5'-CCCAACTTACTTGAGGCTATGG-3' y para la segunda amplificación: directo 5'-CTTCTGCAGCTTGCTCGTC-3', inverso 5'-GCTCAGTTACGCTCAGCTAATC-3'.

Para cada una de las dos reacciones de PCR se utilizó una mezcla maestra Amplitaq Gold® 360 Master Mix (Life Technologies) que contiene polimerasa de ADN, buffer PCR, dNTPs y Cloruro de Magnesio (MgCl₂) en una concentración 2X en base a la concentración recomendada.

Cada reacción se realizó en un volumen total de 12,5 µl, con 8 µl de mezcla maestra, 1µl de cada iniciador (0,5 µM directo e inverso) y 2,5µl (25 ng) de ADN molde.

Las condiciones para cada una de las reacciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94°C durante 10 minutos, 31 ciclos de 94°C, 30 segundos, 55°C, 30 segundos y 65°C 60 segundos, 1 ciclo de 65°C 3 minutos y 4°C tiempo indefinido.

3.3.3 Diagnóstico del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV)

Para diagnosticar la presencia de SCYLV se utilizó la metodología reportada por Girard *et al.* (2010), con modificaciones menores, que consistió en la extracción de ARN, seguido de una Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR).

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó mediante el uso del kit SV Total RNA Isolation System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR)

La RT-PCR para la detección de SCYLV se realizó mediante el uso del kit OneStep RT-PCR Master Mix (Novagen®) en un volumen de 13,0 µl, agregando 10 µl de Master Mix, 1 µl de cada iniciador a una concentración de 6,25 µM y 1 µl (25 ng) de ARN.

Las secuencias e identificación de los iniciadores fueron SCYLVf1: GACAGACTCGGCCAGTGGTCGTG y SCYLVr1: GTAAGCCATTGTTGAACGCTGCG y las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 90°C durante 30 segundos para la activación de la polimerasa, luego la transcripción inversa 60°C durante

30 minutos, una desnaturalización inicial de 94°C durante 1 minuto, seguida de 40 ciclos 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Una extensión final de 60°C durante 7 minutos.

Electroforesis en gel de agarosa

La separación de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % y la adición 1,0 µl de GelRed™ (Biotium) 200X por cada 40ml de agarosa, para la tinción del ADN. La reacción se realizó a 115V durante 45 minutos. Los fragmentos se visualizaron con luz UV (365nm). Un fragmento amplificado de 308 pb fue indicativo de la presencia de la bacteria y un fragmento de 219 pb confirmó la presencia del virus.

3.3.4 Caracterización de cepas de *Xanthomonas albilineans* con base en secuencias genómicas

Secuenciación

De los productos de PCR que fueron positivos para la presencia de *X. albilineans* se seleccionaron 5 provenientes de la localidad San Bonifacio, 9 de la localidad El Retazo y 9 que procedían la localidad Camantulul. Estos 23 productos de amplificación fueron enviados a la empresa Macrogen para ser secuenciados mediante la técnica Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Alineamiento de secuencias

Las secuencias directa e inversa obtenidas, fueron alineadas de acuerdo a la complementariedad de bases para tener mayor grado de confiabilidad. Este alineamiento de secuencias se hizo utilizando el programa Sequencher 5.2.3 (Gene Codes Corporation) con el cual se cortaron los extremos de las secuencias con elevado ruido. Luego del alineamiento fue seleccionada una secuencia consenso, es decir, una secuencia confiable y común en las 23 muestras analizadas, mediante el software Mega6.

Comparación de secuencias y análisis de la diversidad de cepas

El grupo de secuencias consenso fueron comparadas con las secuencias existentes en el GeneBank mediante la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para confirmar la identidad de la bacteria. El alineamiento de todas las secuencias y la búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) se realizó mediante la herramienta Clustal Omega (Goujon *et al.*, 2010).

3.3.5 Prospección

Se realizó una prospección aleatoria en distintas áreas del cultivo para determinar la presencia de *X. albilineans* y virus de la hoja amarilla. Se hicieron los diagnósticos de los materiales de acuerdo a la metodología descrita anteriormente y se presentaron los resultados identificando las áreas en mapas de la zona cañera.

3.3.6 Tratamientos para la eliminación del patógeno

Con el propósito de eliminar la los patógenos presentes en las plantas, los segmentos de tallo que contenían las yemas, fueron sometidos a una serie de tratamientos que incluyeron termoterapia y cultivo de meristemos, solos y combinados. Los tratamientos se integraron de la siguiente forma: T1= control, T2= horno a 40°C durante 10 días, T3= inmersión en agua a 50°C durante 1 hora, T4= inmersión en agua a 50°C durante 3 horas, T5= cultivo de meristemos, T6= horno a 40°C durante 10 días + cultivo de meristemos, T7= inmersión en agua a 50°C durante 1 hora + cultivo de meristemos, T8= inmersión en agua a 50°C durante 3 horas + cultivo de meristemos.

3.3.7 Brotación de yemas y cultivo de meristemos

Posterior al tratamiento, los segmentos de tallo se colocaron en bandejas plásticas con sustrato Sunshine Growing Mix No. 5 (Sun Gro Horticulture) y colocadas en invernadero con una temperatura promedio de 25°C. El porcentaje de brotación se midió 20 días después de la siembra. Las plantas que brotaron de las yemas que fueron asignadas a los tratamientos sin cultivo de meristemos,

se dejaron crecer durante 60 días, luego de lo cual fueron trasladadas a macetas de 0,1 m³ y colocadas fuera del invernadero para continuar su desarrollo. Por otra parte, las plantas que brotaron de las yemas asignadas a los tratamientos con cultivo de meristemas, se trasladaron 10 días después de su germinación, al laboratorio de cultivo de tejidos, donde fueron separadas desde la base de la yema axilar y lavadas con agua y jabón antibacterial. Se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5 % durante 20 minutos y se enjuagaron posteriormente tres veces en agua destilada estéril realizando este proceso dentro de la cámara de flujo laminar. Mediante el uso de estereoscopio, se procedió a la extracción de los meristemas apicales de aproximadamente 0,1-0,2mm de diámetro que se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 % de sacarosa, 0,15 mg/l de bencilaminopurina (BAP), 0,05 mg/l de kinetina, 100 mg/l de myo-inositol, 500 mg/l de polivinilpirrolidona (PVP) y solidificado con 0,2 % de Phytigel™ (Sigma-Aldrich). Los meristemas se sembraron a razón de uno por cada tubo de ensayo y se incubaron en oscuridad durante 7 días. Posteriormente fueron trasladados a condiciones de luz con un fotoperíodo de 16 horas y 25±2°C de temperatura. El subcultivo se hizo cada 30 días en el mismo medio nutritivo. El porcentaje de regeneración de plantas se midió a los 45 días de la siembra.

Las plantas regeneradas 90 días después de la siembra de meristemas, fueron subcultivadas en medio de cultivo MS suplementado con 2% de sacarosa, 100 mg/l de myo-inositol y solidificado con 0,2 % de Phytigel™. El subcultivo se repitió una vez más 15 días después, dejando desarrollar las vitroplantas hasta los 120 días después de la siembra de los meristemas. Una parte de estas plantas se mantiene *in vitro* y otra parte fueron luego trasplantadas a bandejas plásticas con sustrato Sunshine Growing Mix No. 5 y colocadas en invernadero con una temperatura promedio de 25°C durante 60 días. Posteriormente fueron trasladadas a macetas y colocadas fuera del invernadero para continuar su desarrollo.

3.4 Desarrollo de una metodología para la conservación y propagación *in vitro* de germoplasma de caña de azúcar

Cuando se trabaja cultivo de tejidos vegetales se deben seguir tres etapas en el proceso, el establecimiento, la multiplicación y el enraizamiento y cada una debe ser optimizada de acuerdo con las condiciones del laboratorio y de la especie.

3.4.1 Establecimiento y cultivo de las plantas *in vitro*. Evaluación de la respuesta morfogénica en segmentos de hoja en medio de inducción MS: efecto del genotipo y del tipo de explante.

Material vegetal

Se utilizaron ápices de tallos de caña de azúcar con una edad entre 6 y 7 meses provenientes del banco de germoplasma de la estación experimental Camantulul de CENGICAÑA. Las características de producción de estas variedades se muestran en el cuadro 9.

Tratamientos

Los factores a evaluar fueron el genotipo, con 12 niveles (variedades) y la posición de los explantes en el ápice, con dos niveles (basal y distal).

El diseño experimental fue completamente al azar en arreglo factorial 12x2, utilizando 24 tratamientos y tres repeticiones. Cada tratamiento consistió en una combinación de genotipo y tipo de explante. La unidad experimental fue constituida por quince explantes distribuidos en cinco frascos de vidrio con capacidad de 200 ml, conteniendo cada uno 35 ml de medio nutritivo MS y tres discos foliares.

El total de unidades experimentales fue de 120, contenidas en 360 frascos con medio MS adicionado con 0,3 mg/l de BAP.

3. Materiales y métodos

Cuadro 9. Listado de variedades evaluadas, sus progenitores y su productividad promedio

Variedad	Progenitores		Productividad de Azúcar		
			Media Tres Cortes		
	Femenino	Masculino	TM azúcar/ha	Sacarosa en jugo (%)	TM caña/ha
CG98-78	TUC6819	CP57-603	18,8	14,7	129
CG98-46	CP56-59	CP57-603	18,8	14,7	128,6
CG98-10	PR87-2078	PR87-2073	18,8	14,7	128,6
CG00-102	CP63-588	Co421/2086/ 63588	19,7	15,9	125
CG00-033	CG95-125	CP81-1384	21,6	15,8	137
CG02-163	CP65-357	CP72-2086	24,3	14,6	167
CG01-53	SP71-6180	CP88-1508	23,0	15,2	151,7
CG03-025	CP88-1508	CP57-603	23,6	14,9	159,2
CG03-098	C11-667	CP57-603	23,3	15,0	155,5
CG03-104	CB46-47	CP57-603	18,9	15,0	125
CG03-256	CB46-47	CP57-603	24,1	14,8	162
CG03-240	CB46-47	CP57-603	23,9	15,6	153

Datos de productividad a nivel experimental en pruebas regionales

Variables respuesta

Las variables respuesta que se registraron fueron: porcentaje de explantes con plantas regeneradas a los 35 y 45 días después de la siembra (dds), el número de plantas regeneradas por explante a los 45 dds y la eficiencia de la regeneración de plantas a los 45 dds, calculada como el producto del porcentaje de regeneración por el número de plantas regeneradas.

Manejo del experimento

Los ápices de tallos que se obtuvieron en campo se terminaron de cortar dentro del laboratorio hasta dejar un segmento de aproximadamente 30 cm por arriba del último nudo. Se realizó una desinfección de los ápices de tallos con agua y alcohol al 70% durante 5 minutos, luego con hipoclorito de sodio al 2,5% durante 25 minutos. Posterior a esto se realizaron tres lavados con agua desmineralizada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Se eliminaron aproximadamente 3 hojas externas del ápice hasta dejar un cilindro foliar formado por las hojas más jóvenes. Los discos de hoja se cortaron transversalmente con un grosor de aproximadamente 0,5 cm.

El ápice se dividió en dos segmentos, basal y distal. El primero de ellos abarcó los primeros cinco centímetros a partir de la yema terminal, y el segundo los cinco centímetros siguientes.

Los segmentos obtenidos se sembraron en cajas de Petri con un medio nutritivo MS sólido para inducir la formación de yemas adventicias mediante la adición de 3 mg de 2,4-D /l; 30 gramos de sacarosa/l y 2 gramos de Phytigel®/l como agente solidificante.

Los discos se incubaron en oscuridad durante 15 días a una temperatura de 25°C. Tras la incubación, los discos fueron trasladados a frascos con medio nutritivo MS sólido adicionado con 0,3 mg/l de BAP (sin 2,4-D); en presencia de luz, con un fotoperiodo de 16 horas, manteniendo la temperatura alrededor de los 25 °C durante 30 días luego de los cuales se registraron las variables respuesta.

3.4.2 Evaluación de distintas combinaciones de reguladores del crecimiento en la multiplicación de plantas

En este experimento, el objetivo fue evaluar el efecto de diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (BAP), 6-furfurilaminopurina (kinetina) y ácido naftalenacético (ANA), sobre el proceso de propagación *in vitro* de variedades guatemaltecas de caña de azúcar. Se utilizaron las variedades CG98-10 y CG02-163 y se evaluó también el efecto del genotipo sobre las variables respuesta.

Tratamientos

Los tratamientos del primer experimento se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Identificación de los tratamientos y niveles de reguladores que los componen

Tratamiento	BAP	KIN	ANA
1	0	0	0
2	0,3	0	0
3	0,3	0,1	0,01
4	0,3	1	0
5	0,3	0	0,01
6	0,3	0,1	0
7	0,3	1	0,01
8	0,9	0	0
9	0,9	0,1	0,01
10	0,9	1	0
11	0,9	0	0,01
12	0,9	0,1	0
13	0,9	1	0,01
14	2,7	0	0
15	2,7	0,1	0,01
16	2,7	1	0
17	2,7	0	0,01
18	2,7	0,1	0
19	2,7	1	0,01

Manejo del experimento

Se regeneraron plantas mediante cultivo de discos foliares, utilizando el procedimiento desarrollado por Franklin *et al.* (2006) y descrito en manejo del experimento de la sección 3.4.1. Las variables respuesta, número de plantas obtenidas y altura de planta fueron medidas 45 días después de la siembra. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en arreglo bifactorial de los tratamientos 19 x 2, con 6 repeticiones siendo los tratamientos y las variedades, respectivamente, los factores. Posteriormente, para poder analizar el efecto de los factores que componían los tratamientos, se eliminó el tratamiento 1 (control absoluto), de tal forma que los resultados pudieron analizarse en un diseño completamente al azar en arreglo trifactorial 3 x 3 x 2, siendo los factores BAP, KIN y ANA.

3.4.3 Enraizamiento de plantas *in vitro* y su supervivencia al trasplante

Este experimento se hizo con el objetivo de evaluar el efecto de tres factores, genotipo, tipo de auxina y concentración de la auxina en el medio de cultivo, sobre el número y longitud de raíces producidas *in vitro*.

Tratamientos

Los tratamientos, factores y niveles de los factores se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Tratamientos evaluados, factores y niveles que los componen

Tratamiento	Variedad	Regulador	Concentración (mg/l)
1	CG02-163	AIB	0
2	CG02-163	AIB	2
3	CG02-163	AIB	4
4	CG02-163	AIB	6
5	CG02-163	ANA	0
6	CG02-163	ANA	2
7	CG02-163	ANA	4
8	CG02-163	ANA	6
9	CG98-10	AIB	0
10	CG98-10	AIB	2
11	CG98-10	AIB	4
12	CG98-10	AIB	6
13	CG98-10	ANA	0
14	CG98-10	ANA	2
15	CG98-10	ANA	4
16	CG98-10	ANA	6

Manejo del experimento

La producción de plantas se realizó de manera descrita en la sección 3.4.1 con el medio MS + 0,3 mg/l de BAP y las plantas obtenidas fueron separadas individualmente de los conglomerados y cortadas a 1 cm de longitud aproximadamente. Cada planta fue sembrada en un tubo de ensayo de 25 mm x 125 mm conteniendo medio de cultivo MS con los reguladores de acuerdo a los tratamientos descritos en el Cuadro 11. Además, el medio de cultivo fue suplementado con 20 g de sacarosa/l y 2 g de Phytigel®/l como agente solidificante.

La medición y registro de las variables respuesta, número de raíces y longitud de raíces se realizó 45 días después de la siembra. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo trifactorial 2 x 2 x 4, para formar 16 tratamientos resultantes de la combinación de cada uno de los factores con 4 repeticiones. Se individualizaron plantas de los conglomerados de plantas enraizadas y se trasplantaron a bandejas de 24 celdas bajo condiciones de invernadero, sembrando 6 plantas por cada tratamiento y repetición. La sobrevivencia se registró a los 30 días después del trasplante.

3.4.4 Inducción de la regeneración a partir de explantes de hoja. Efecto del genotipo y la concentración de 2,4-D

Material vegetal

En este experimento se utilizaron las variedades CG98-10 y CG02-163, cuyas características se muestran en el Cuadro 9.

Tratamientos

Fueron ocho tratamientos, cada tratamiento resultante de la combinación de los dos factores evaluados:

Tratamiento 1: CG98-10; 1 mg de 2,4-D/l

Tratamiento 2: CG98-10; 2 mg de 2,4-D/l

Tratamiento 3: CG98-10; 3 mg de 2,4-D/l

Tratamiento 4: CG98-10; 4 mg de 2,4-D/l

Tratamiento 5: CG02-063; 1 mg de 2,4-D/l

Tratamiento 6: CG02-063; 2 mg de 2,4-D/l

Tratamiento 7: CG02-063; 3 mg de 2,4-D/l

Tratamiento 8: CG02-063; 4 mg de 2,4-D/l

Las variables respuesta y el manejo del experimento se trabajaron de la forma descrita en la sección 3.4.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar y selección de materiales de interés utilizando marcadores moleculares.

4.1.1 Estudio de la variabilidad en germoplasma de caña de azúcar utilizando marcadores tipo microsatélite.

Se ha iniciado el análisis de 204 variedades procedentes de Argentina, Australia, Barbados, Brasil, Estados Unidos, Guatemala, India, Indonesia, México, Puerto Rico y Reunión. Los tres marcadores utilizados amplificaron fragmentos que en su mayoría se mostraron polimórficos, originando distintos patrones de bandas en las variedades como puede observarse en la figura 7 donde se muestra la separación de los productos amplificados en 7 variedades para los tres marcadores tras la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y la tinción con plata.

El rango de tamaños de los fragmentos obtenidos para el marcador CV29 fue de 88-910 pb; para CV37 de 101-1269 pb y para CV38 entre 120-1010 pb. En comparación con los resultados obtenidos por Maccheroni *et al.*, (2007), quienes obtuvieron bandas en un rango de 102-199 pb, observamos que hemos amplificado bandas dentro y fuera de este rango, siendo estas últimas inespecíficas. De estos resultaron polimórficos 18 en los primeros marcadores y 12 en CV38 (Cuadro 12). En este cuadro también se muestran las frecuencias alélicas obtenidas para cada locus.

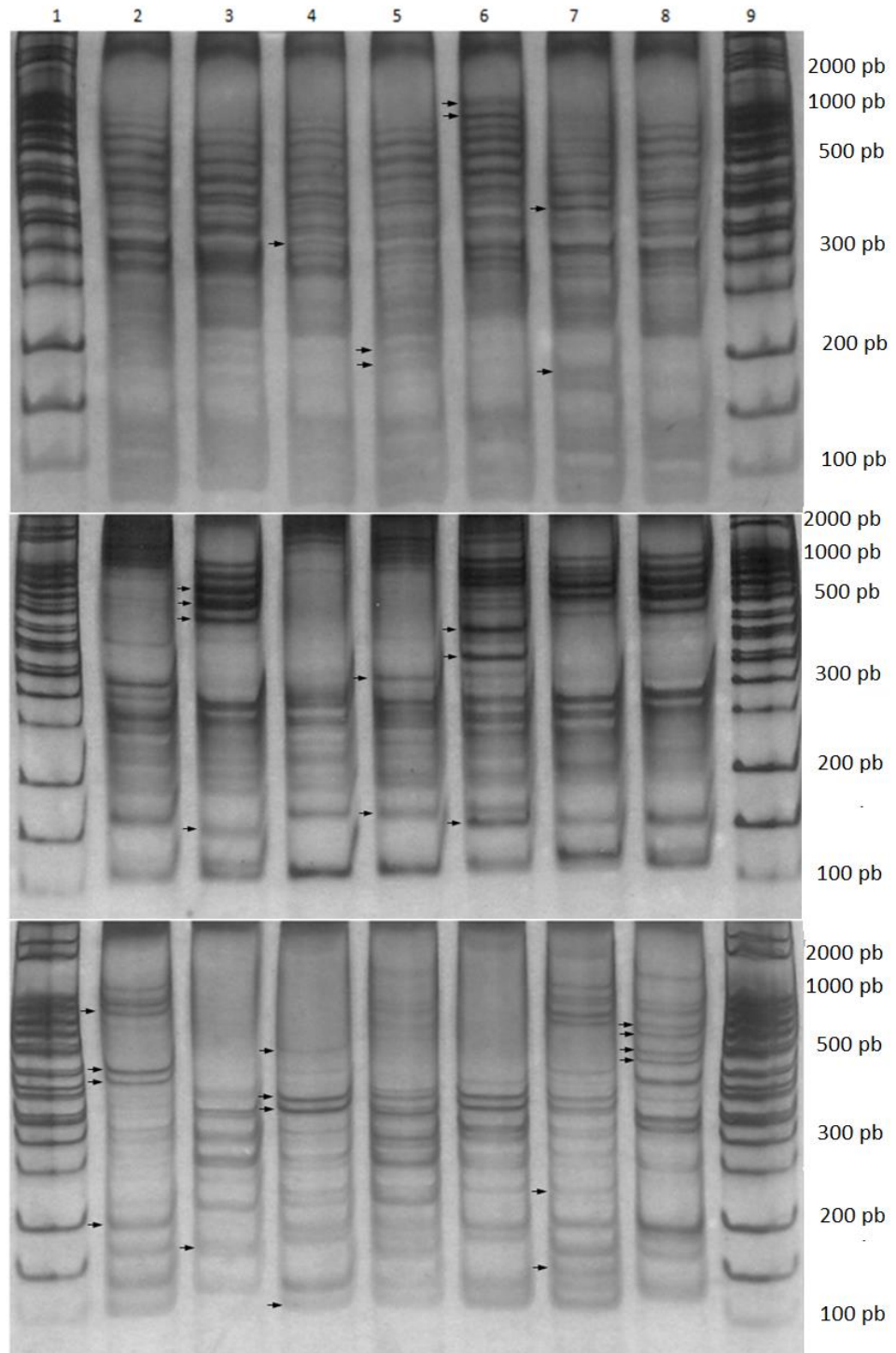


Figura 7. Bandas de ADN amplificadas con el marcador CV29 (arriba), CV37 (centro) y CV38 (abajo) en 7 variedades. Las flechas muestran algunas bandas polimórficas. Carriles: 1=marcador de masa molecular, 2=CP00-1763, 3=CP86-1705, 4=CP01-1750, 5=CP86-1747, 6=CP03-2212, 7=CP29-126, 8=CP00-1748, 9=marcador de masa molecular.

4. Resultados y discusión

Cuadro 12. Número de bandas y frecuencias génicas de los alelos: ausencia de banda (0) y presencia (1) . Bandas obtenidas mediante la utilización de los pares de iniciadores CV29, CV37 y CV38 en una población de 204 variedades de caña de azúcar.

Alelo	Locus	CV29-1	CV29-2	CV29-3	CV29-4	CV29-5	CV29-6	CV29-7	CV29-8
Alelo	0			0,5333	0,3833	0,3442	0,5198	0,6041	0,6745
Alelo	1	1	1	0,4667	0,6167	0,6558	0,4802	0,3959	0,3255
Alelo	Locus	CV29-9	CV29-10	CV29-11	CV29-12	CV29-13	CV29-14	CV29-15	CV29-16
Alelo	0	0,7154	0,7939	0,631	0,7999	0,7909	0,685	0,6119	0,6987
Alelo	1	0,2846	0,2061	0,369	0,2001	0,2091	0,315	0,3881	0,3013
Alelo	Locus	CV29-17	CV29-18	CV29-19	CV29-20	CV29-21	CV37-1	CV37-2	CV37-3
Alelo	0	0,7819	0,7879	0,576	0	0,6119	0,7088	0,7478	0,7286
Alelo	1	0,2181	0,2121	0,424	1	0,3881	0,2912	0,2522	0,2714
Alelo	Locus	CV37-4	CV37-5	CV37-6	CV37-7	CV37-8	CV37-9	CV37-10	CV37-11
Alelo	0	0,7635	0,671	0,3894	0,5962	0,735	0,7758	0,7819	0,8318
Alelo	1	0,2365	0,329	0,6106	0,4038	0,265	0,2242	0,2181	0,1682
Alelo	Locus	CV37-12	CV37-13	CV37-14	CV37-15	CV37-16	CV37-17	CV37-18	CV37-19
Alelo	0	0,6458	0,5922	0,8058	0,3155	0,5677	0,5962	0,6567	0
Alelo	1	0,3542	0,4078	0,1942	0,6845	0,4323	0,4038	0,3433	1
Alelo	Locus	CV38-1	CV38-2	CV38-3	CV38-4	CV38-5	CV38-6	CV38-7	CV38-8
Alelo	0	0	0	0	0,6234	0,6157	0,6119	0,5719	0,6196
Alelo	1	1	1	1	0,3766	0,3843	0,3881	0,4281	0,3804
Alelo	Locus	CV38-9	CV38-10	CV38-11	CV38-12	CV38-13	CV38-14	CV38-15	
Alelo	0	0,6531	0,7879	0,4188	0,6884	0,5288	0,4964	0,6745	
Alelo	1	0,3469	0,2121	0,5812	0,3116	0,4712	0,5036	0,3255	

El número de alelos observados, número de alelos efectivos y el índice de diversidad genética para cada uno de los locus se refleja en el cuadro 13. Puesto que el número total de loci polimórficos obtenidos con estos tres marcadores es de 48 (en promedio 16 por marcador), en nuestro estudio el porcentaje de loci polimórficos es de 87,27 % (loci polimórficos/total de loci). Este número de loci polimórficos se considera suficiente para caracterizar la diversidad genética de la población. Resultados similares reportan Maccheroni *et al.* (2007), que con 53 loci provenientes de los mismos marcadores fueron capaces de discriminar 1.205 variedades de distintas procedencias con al menos 2 diferencias (alelos discriminativos). También You *et al.* (2013) utilizando 5 marcadores SSR diferentes, para caracterizar 105 variedades usadas como progenitores, obtuvieron 88 loci polimórficos (promedio de 18 por marcador). En otros estudios se reporta el uso de mayor número de marcadores, aunque menos informativos, como el de Que *et al.* (2014) quienes obtuvieron 163 fragmentos polimórficos en 20 marcadores SCoT (Start Codon Targeted Polymorphism), con un promedio de 8 fragmentos por marcador, o Perera *et al.* (2012) con 101 fragmentos de 15 marcadores SSR, lo que da un promedio de 7 fragmentos por marcador.

4. Resultados y discusión

Cuadro 13. Resumen de la variación genética para todos los loci, utilizando los iniciadores CV29, CV37 y CV38 en una población de 204 variedades de caña de azúcar.

No.	Locus	Tamaño	na*	ne*	h*	No.	Locus	Tamaño	na*	ne*	h*
1	CV29-1	204	1	1	0	30	CV37-9	204	2	1,5334	0,3478
2	CV29-2	204	1	1	0	31	CV37-10	204	2	1,5176	0,3411
3	CV29-3	204	2	1,9912	0,4978	32	CV37-11	204	2	1,3885	0,2798
4	CV29-4	204	2	1,8967	0,4728	33	CV37-12	204	2	1,8433	0,4575
5	CV29-5	204	2	1,823	0,4515	34	CV37-13	204	2	1,9342	0,483
6	CV29-6	204	2	1,9969	0,4992	35	CV37-14	204	2	1,4556	0,313
7	CV29-7	204	2	1,9169	0,4783	36	CV37-15	204	2	1,7603	0,4319
8	CV29-8	204	2	1,7828	0,4391	37	CV37-16	204	2	1,964	0,4908
9	CV29-9	204	2	1,6868	0,4072	38	CV37-17	204	2	1,9286	0,4815
10	CV29-10	204	2	1,4863	0,3272	39	CV37-18	204	2	1,8211	0,4509
11	CV29-11	204	2	1,8716	0,4657	40	CV37-19	204	1	1	0
12	CV29-12	204	2	1,4709	0,3201	41	CV38-1	204	1	1	0
13	CV29-13	204	2	1,4941	0,3307	42	CV38-2	204	1	1	0
14	CV29-14	204	2	1,7592	0,4316	43	CV38-3	204	1	1	0
15	CV29-15	204	2	1,9046	0,475	44	CV38-4	204	2	1,8852	0,4695
16	CV29-16	204	2	1,7273	0,4211	45	CV38-5	204	2	1,8983	0,4732
17	CV29-17	204	2	1,5176	0,3411	46	CV38-6	204	2	1,9046	0,475
18	CV29-18	204	2	1,5019	0,3342	47	CV38-7	204	2	1,9595	0,4897
19	CV29-19	204	2	1,9549	0,4885	48	CV38-8	204	2	1,8918	0,4714
20	CV29-20	204	1	1	0	49	CV38-9	204	2	1,8286	0,4531
21	CV29-21	204	2	1,9046	0,475	50	CV38-10	204	2	1,5019	0,3342
22	CV37-1	204	2	1,7031	0,4128	51	CV38-11	204	2	1,9486	0,4868
23	CV37-2	204	2	1,6056	0,3772	52	CV38-12	204	2	1,7513	0,429
24	CV37-3	204	2	1,6543	0,3955	53	CV38-13	204	2	1,9934	0,4983
25	CV37-4	204	2	1,5653	0,3611	54	CV38-14	204	2	1,9999	0,5
26	CV37-5	204	2	1,7906	0,4415	55	CV38-15	204	2	1,7828	0,4391
27	CV37-6	204	2	1,9068	0,4756						
28	CV37-7	204	2	1,9286	0,4815		Media	204	1,8727	1,6722	0,3743
29	CV37-8	204	2	1,638	0,3895		Desviacion estandar		0,3363	0,309	0,1556

na = Numero observado de alelos

ne = Numero efectivo de alelos [Kimura y Crow (1964)]

h = Indice de Diversidad genética [Nei (1973)]

El numero de loci Polimorficos es : 48

El Porcentaje de loci polimorficos es: 87.27%

Los valores de PIC (Contenido de Información Polimórfica) o Índice de Diversidad Genética (Cuadro 8), abarcaron un rango de 0,28-0,50 (promedio 0,37). El marcador CV37 fue el más informativo de los tres con un PIC promedio de 0,39, para CV29 y CV38 se obtuvieron promedios de 0,36 y 0,37, respectivamente. Estos marcadores fueron más informativos que los utilizados por Perera *et al.* (2012) quienes utilizaron 15 marcadores SSR diferentes a los nuestros en una población de 36 variedades, cuyo rango de PIC varió entre 0,18-0,32. Este rango indica que también existe mayor diversidad genética en nuestra población que en la evaluada por You *et al.* (2013) en la que se obtuvo un índice de diversidad genética promedio de 0,22 en 115 variedades y la evaluada por Que *et al.* (2014) con 0,26 en 107 variedades.

4. Resultados y discusión

A pesar de que los marcadores SSR se clasifican como codominantes, debido a la naturaleza poliploide de la caña de azúcar cada marcador fue calificado como dominante y transformados a una matriz de 0 (ausencia) o 1 (presencia) para el cálculo de los coeficientes de similitud.

La representación de la variabilidad obtenida utilizando un análisis de coordenadas principales (Figura 8) muestra una dispersión de las 204 variedades analizadas, sin diferenciaciones claras, aunque en su distribución, es posible observar que la mayoría de variedades agrupa en la mitad derecha del plano, mientras que en la mitad izquierda las variedades son menos y están más dispersas.

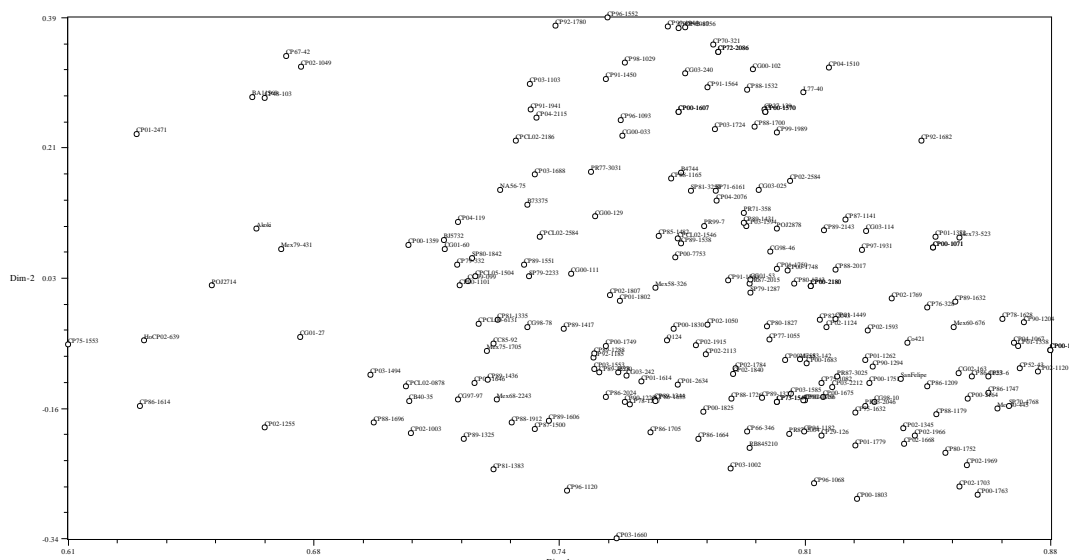


Figura 8. Representación gráfica de la dispersión de las 204 variedades obtenida mediante análisis de coordenadas principales.

En el trabajo realizado por Que *et al.* (2014), se analizó la diversidad genética de 107 variedades tomando 0,674 como valor arbitrario del coeficiente de similitud, con el cual definieron 6 grupos. En nuestro trabajo, al tomar como referencia arbitraria 0,60 como coeficiente máximo de similitud, es posible distinguir 20 grupos de variedades, los cuales se muestran en los siguientes dendrogramas (Figuras 8-12), elaborados con base en la matriz de similitud generada mediante los cálculos del coeficiente de Dice.

En la Figura 9 puede observarse que en el grupo I aparece solamente la variedad Akoki, con un coeficiente de similitud de 0,52 respecto a los demás grupos, lo cual tiene sentido considerando que es el único de los materiales que no es un híbrido mejorado, sino un

clon hawaiano de *Saccharum officinarum* (Schenk *et al.*, 2004). Los grupos II y III muestran entre ellos una similitud de 0,58 y de 0,56 con los demás materiales. En el grupo II encontramos la variedad guatemalteca CG99-099 y la argentina NA56-75. El grupo III quedó formado por las variedades CP01-2471 y CP02-1049 y una variedad de Puerto Rico (PR77-3031), siendo las dos últimas las que presentan mayor similitud.

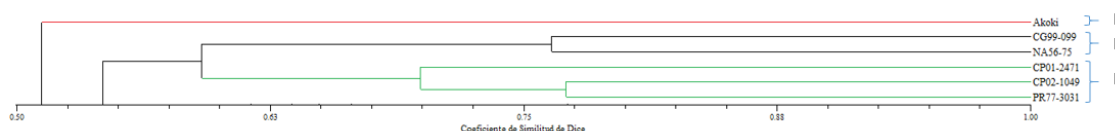


Figura 9. Variedades que conforman los grupos I a III y sus coeficientes de similitud

En la figura 10 se muestra que en el grupo IV, junto con las variedades CP también agruparon las variedades L77-40 (Luisiana, Estados Unidos), B4744 de Barbados, SP71-6161 de Sao Paulo, Brasil, PR71-358 de Puerto Rico y algunas variedades guatemaltecas, CG00-111, CG03-240, CG03-025. En este mismo grupo encontramos dos variedades incluidas en duplicado CP72-2086 y CP00-1607 con quienes tienen una similitud de 100 %, como se esperaba. En el grupo V agruparon ocho variedades CP, entre ellas CP91-2087 y CP92-1780 que mostraron el mayor coeficiente de similitud entre todas (0,90), dos variedades de Barbados BJ5732 y B73375, además de PR99-7 y cuatro variedades guatemaltecas, tres de la serie CG03 y una CG98. En el grupo VI, tres variedades de origen diverso, México, Colombia y Puerto Rico.

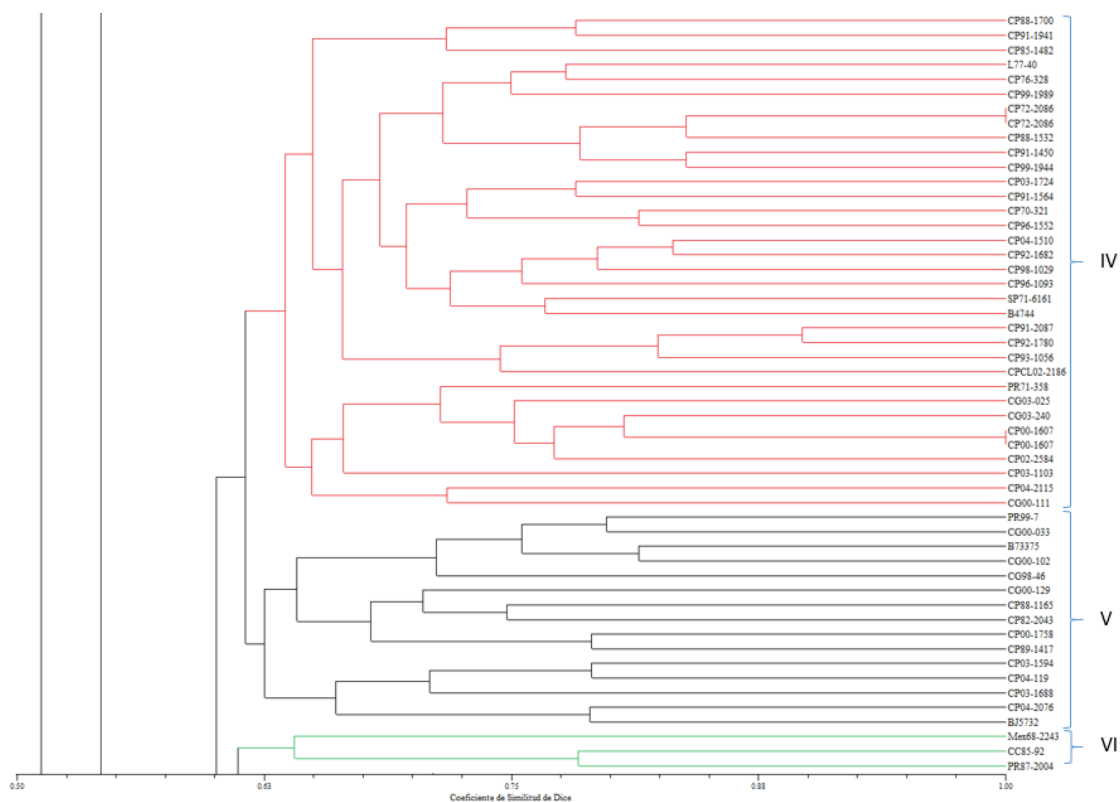


Figura 10. Variedades que conforman los grupos IV a VI y sus coeficientes de similitud

El grupo VII es el más numeroso (Figuras 11 y 12), agrupa 114 variedades, de ellas 93 CP, 5 variedades de México (Mex), 4 de Guatemala, 3 de Puerto Rico (PR), 4 de Brasil, siendo 3 de ellas Sao Paulo (SP79-1287, SP70-4768 y SP81-3250) y una República de Brasil (RB84-5210). También agrupan aquí las variedades San Felipe, de origen desconocido, R570 de Reunión, Q124 de Australia, Co421 de India y POJ2878 de Indonesia, que es una de las primeras variedades resultantes de la nobilización de híbridos interespecíficos y una de las más utilizadas en los programas de mejora genética en todo el mundo (Moore *et al.*, 2014). En este grupo encontramos también 5 variedades duplicadas CP00-1071, CP00-1100 y CP00-2180, CP00-1570 y CP73-1547.

4. Resultados y discusión

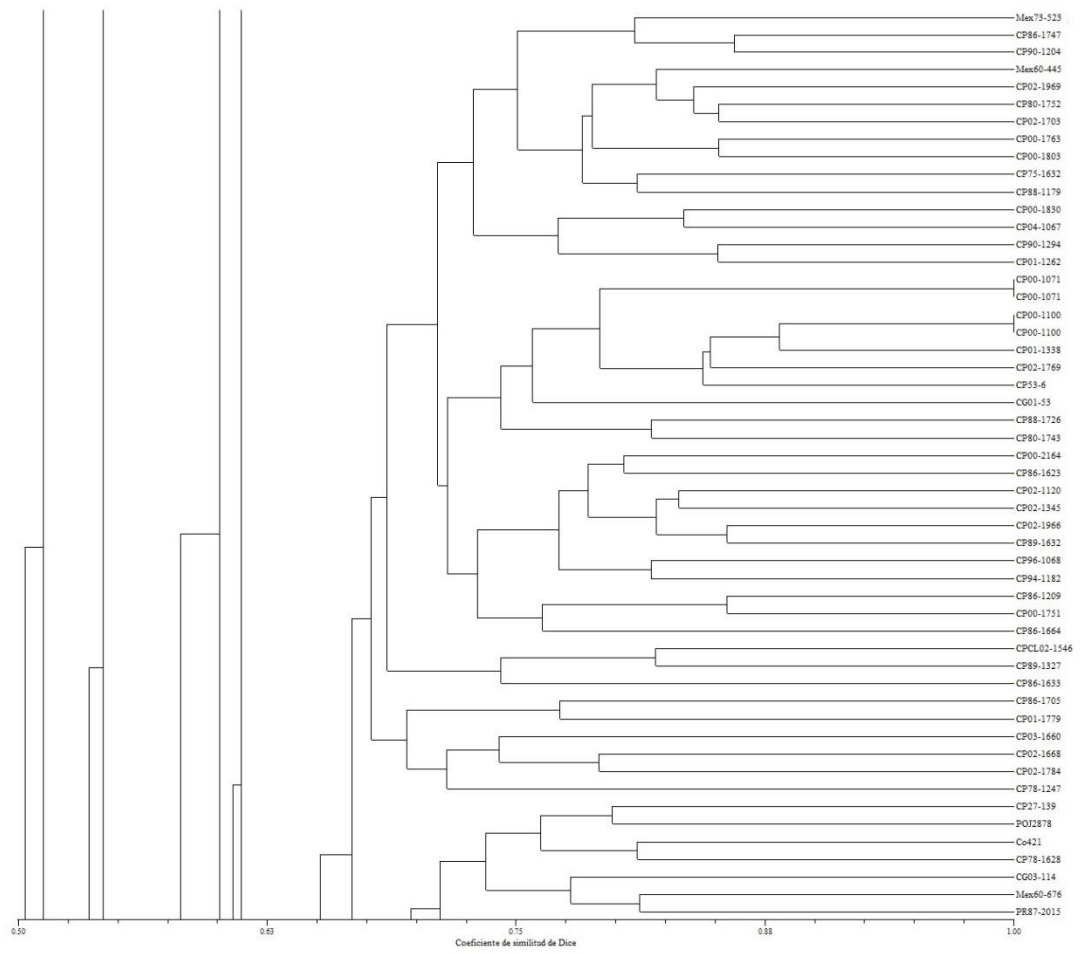


Figura 11. Variedades que conforman el grupo VII y sus coeficientes de similitud

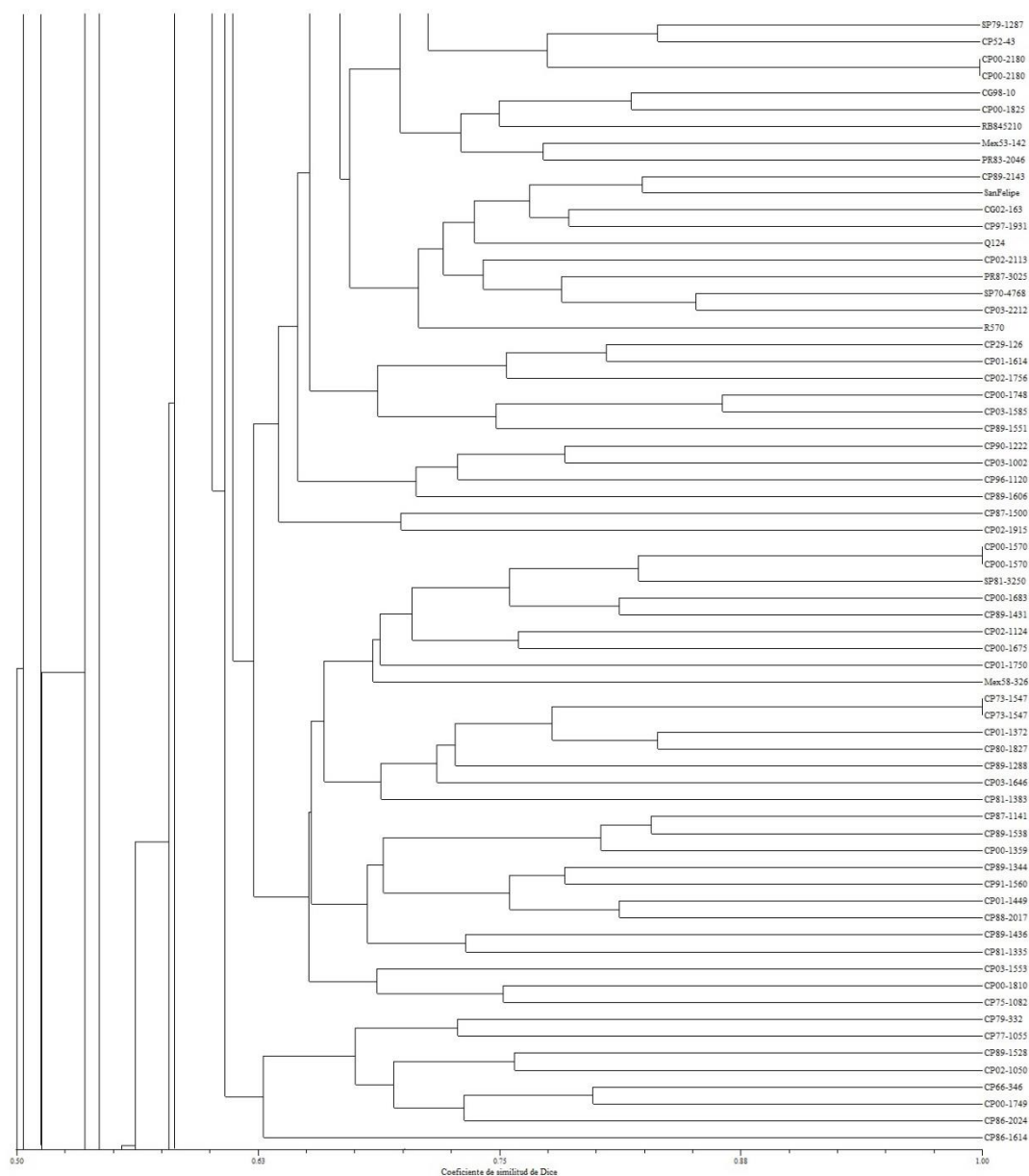


Figura 12. Continuación de las variedades que forman el grupo VII

La figura 13 muestra los grupos VIII a XX, formados cada uno por un reducido número de variedades, siendo el X el mayor, con 12 variedades, 4 de ellas guatemaltecas y las demás de origen CP. Los grupos XIV, XVI, XVII, XIX y XX formados cada uno por una sola variedad de orígenes diversos, CB40-35 (Brasil), BA11569 (Barbados), Mex79-431 (México), CP75-1553 (Estados Unidos) y POJ2714 (Indonesia), siendo esta última la que presenta la menor similitud con relación a todas las demás variedades analizadas (0,50).

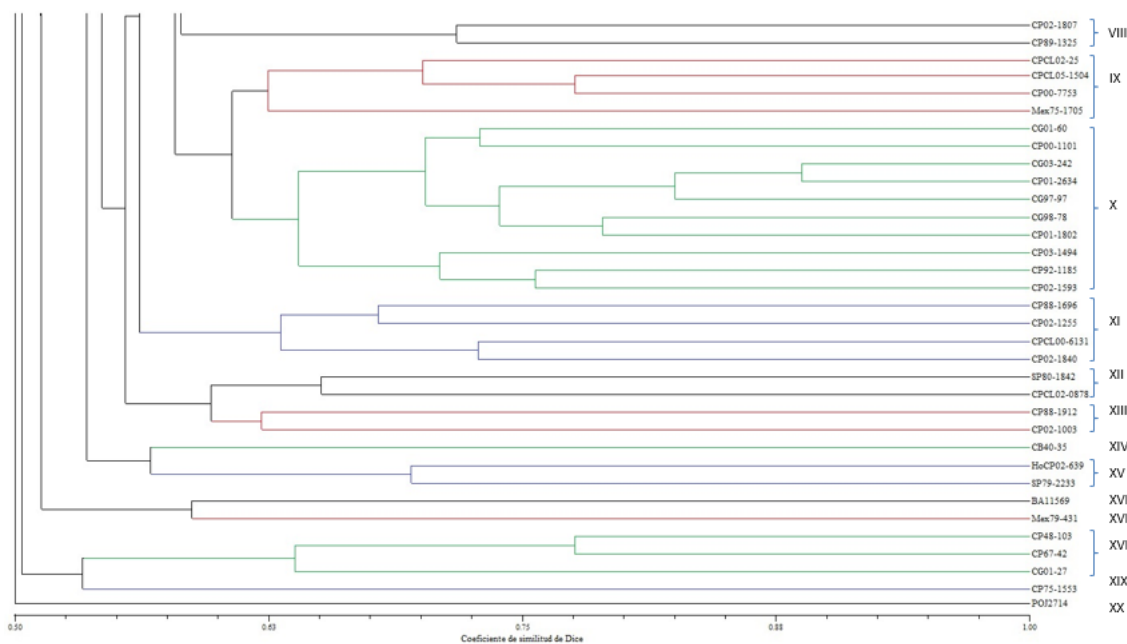


Figura 13. Variedades que conforman los grupos XI a XX y sus coeficientes de similitud

Las 204 variedades analizadas no agruparon separadamente de acuerdo con los programas de mejoramiento y selección de donde proceden, lo que probablemente se deba al intercambio de variedades que realizan y a su uso como progenitores. Las 147 variedades procedentes de Canal Point (CP), Estados Unidos se distribuyeron en 12 de 20 grupos, lo que indica que a pesar de provenir del mismo programa de cruza, tienen alta diversidad. Las variedades de procedencia distinta a Canal Point, Estados Unidos, también quedaron distribuidas en los diferentes grupos (15 de 20). El análisis de coeficientes de similitud muestra que en esta población de 204 variedades, si se excluyen los coeficientes de similitud igual a 1 entre las 7 variedades con duplicados, los demás coeficientes varían entre 0,50-0,90 (0,50 para la variedad POJ2714 con las demás variedades y 0,90 entre las variedades CP91-2087 y CP92-1780). Nuestros resultados difieren de los reportados por Perera *et al.* (2012) lo cual es esperable puesto que analizaron 36 variedades, ninguna en común con nuestro estudio. Estos autores utilizaron 15 marcadores SSR también diferentes a los nuestros, encontrando que todas formaron un solo grupo con coeficientes de similitud entre 0,73 y 0,96. También difieren con los resultados obtenidos por Pan *et al.* (2007), quienes utilizando 21 marcadores SSR diferentes a los nuestros en 116 variedades de los programas de mejoramiento de Luisiana, Estados Unidos (ninguna incluida en nuestro estudio), encontraron que, con

excepción de 3 variedades, las restantes 113 agruparon con coeficientes de similitud iguales o superiores a 0,7.

Por otro lado, You *et al.* (2013), analizaron la diversidad genética en 115 variedades progenitoras originadas en programas de mejoramiento de China, utilizando 5 marcadores SSR diferentes a los nuestros, identificando tres grupos formados por 91 (79 %), 7 (6 %) y 17 (15 %) variedades. En nuestro caso, el grupo VII abarcó la mayor cantidad de materiales, con 114 de 204 (56 %).

En Guatemala, tres variedades CP ocupan aproximadamente el 80 % del área sembrada con caña de azúcar, CP70-2086, CP73-1547 y CP88-1165. De acuerdo con nuestro análisis, estas variedades tienen coeficientes de similitud menores a 0,60 y se ubicaron en los grupos IV, V y VII, lo que muestra su valor para uso en un programa de cruza. Algunas de las variedades provenientes de Canal Point como las mencionadas, han mostrado buena adaptación y rendimientos superiores. Las primeras variedades con buena adopción resultantes del mejoramiento en Guatemala, también han tenido como progenitores a variedades CP en su mayoría, lo cual explica en parte, la preferencia local por utilizar progenitores de esta procedencia.

De acuerdo con Moore *et al.* (2014), es de esperar que la diversidad genética sea baja en las actuales poblaciones de mejoramiento, si se considera que las variedades modernas se derivan esencialmente de entre 15-20 variedades nobilizadas, las que a su vez nos conducen a la base genética inicial nobilizada en Java e India. Aunque se han utilizado en el marco de este trabajo tres marcadores (CV29, CV37 y CV38) que han resultado útiles para un primer análisis de diversidad genética en híbridos de caña de azúcar, la población analizada se está analizando actualmente con otros 7 marcadores moleculares que lo cual nos permitirá definir mejor las diferencias entre grupos.

La información que hemos obtenido nos sirve para planificar cruza entre progenitores distantes que tengan mayor probabilidad de progenies con buena expresión de heterosis, evitando al mismo tiempo reducir la ya estrecha base genética de la caña de azúcar cultivada.

4.2 Identificación de materiales de interés portadores del alelo *Bru1* asociado con la resistencia a la enfermedad de la roya marrón y análisis comparativo del fenotipo

La roya marrón, causada por el hongo *Puccinia melanocephala* es una limitante para obtener altos rendimientos en los sistemas de producción de caña de azúcar y la resistencia genética a la enfermedad es una característica deseable en las variedades comerciales que están siendo desarrolladas en Guatemala. En este trabajo, la utilización del marcador *Bru1* descrita por Costet et al. (2012) nos ha permitido amplificar el alelo de resistencia a roya marrón asociado al marcador *Bru1* en 77 de las 303 variedades analizadas en este estudio (25 %). La amplificación de una banda de 570 pb puede observarse en la Figura 14 en una muestra de las variedades analizadas. Así, en los carriles 4, 5 y 6 que se corresponden con las variedades CP00-2180, CP02-1840 y CP88-1508 se observa la amplificación tal y como sucede para el control positivo, la variedad R570, que fue la variedad en la cual se identificó este marcador. La variedad CP57-603 fue utilizada como control negativo.

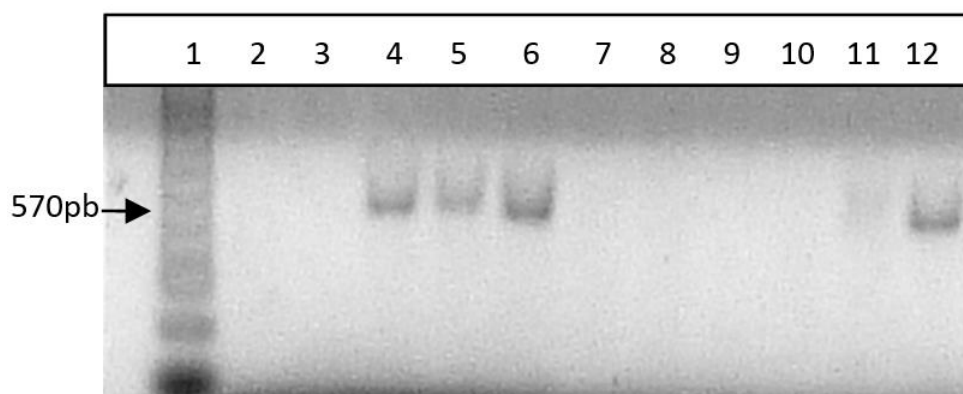


Figura 14. Gel de agarosa (negativo de la fotografía) que muestra la banda asociada al alelo *Bru1* de resistencia a roya marrón. Carriles: 1=marcador de masa molecular 100 pb, 2=CP57-603 (control negativo), 3=CP03-1660, 4=CP00-2180, 5=CP02-1840, 6=CP88-1508, 7=CP00-1763, 8=CP86-1705, 9=CP01-1750, 10=CP86-1747, 11=CP03-2212, 12=R570 (control positivo).

El porcentaje de germoplasma portador del alelo *Bru1* obtenido en este trabajo es del 25 % y, está en el rango del obtenido por Glynn *et al.* (2012) tras analizar 1.072 variedades diferentes, hallaron el alelo *Bru1* en el 27 %. Estos rangos son inferiores a los encontrados por Costet *et al.* (2012) tras analizar 380 variedades (43,9 %) y superiores a los descritos por Parco *et al.* (2014), quienes encontraron el alelo de resistencia en

solo 5 variedades de 117 clones comerciales y variedades de élite analizadas (4,3 %). En estas investigaciones realizaron comparaciones con los fenotipos observados durante un ciclo de cultivo en una o dos localidades, a diferencia de la nuestra en la que el fenotipo se evaluó durante cuatro años en dos localidades.

Los datos de resistencia/susceptibilidad observados en distintas anualidades en estas variedades nos han permitido clasificarlas como resistentes o susceptibles. Se consideró que una variedad es fenotípicamente susceptible cuando en al menos una localidad o año, la incidencia de la enfermedad fue superior a 12 % y la reacción de la variedad fue mayor a 5, de acuerdo con el método de evaluación de Purdy y Dean (1981). El registro de datos de las evaluaciones fenotípicas se presenta en el Anexo 1.

La sintomatología que muestran las plantas sensibles a la infección se muestra en la siguiente figura (Figura 15).

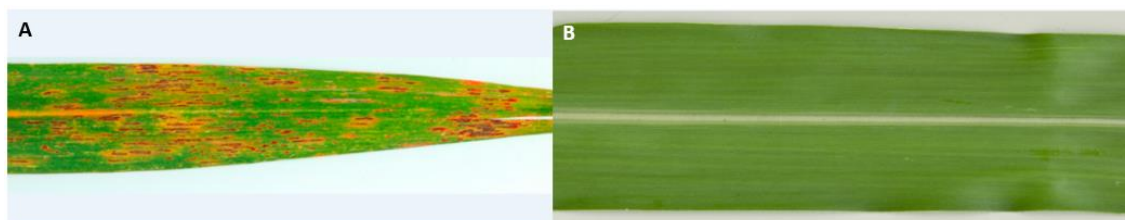


Figura 15. Comparación de hojas de caña de azúcar. (A) hoja de la variedad CG97-97 infectada con roya marrón con incidencia = 15 y reacción = 6, de acuerdo con la escala de Purdy y Dean (1981) y (B) hoja de la variedad R570, inmune al patógeno. Crédito fotografías: Fredy Rosales-Longo

La comparación de los datos fenotípicos con el genotipado realizado con el marcador *Bru1* (Cuadro 14), indica que todas las variedades en las que se obtuvo amplificación del marcador *Bru1*, 77 (25 %) mostraron resistencia a la enfermedad. Por otra parte, 21 variedades (7 %) que se mostraron fenotípicamente susceptibles no amplificaron el alelo de resistencia. Este hecho confirma la utilidad del marcador en programas de mejora para selección de materiales. Sin embargo, en las 207 (68 %) variedades restantes, no se observaron síntomas de la enfermedad pero no se obtuvo amplificación del alelo de resistencia *Bru1*. Por lo tanto, puede decirse que la presencia del marcador en las

variedades que lo portan, está fuertemente asociada con resistencia al patógeno. Sin embargo, la ausencia de este marcador no es indicativo de susceptibilidad, pues de las variedades que no lo portan, solamente el 9 % (21 de 228) fueron consideradas fenotípicamente susceptibles, mientras que el restante 91 % (207 de 228) fueron consideradas resistentes. Este hecho podría deberse a que al ser una infección natural, es decir, sin inoculación del hongo estas plantas no estuvieran infectadas o bien, a la presencia de otro alelo de resistencia distinto. La infección de variedad sensible CP57-603 utilizada como control en todas las anualidades y el alto porcentaje de variedades no infectadas nos hacen pensar que es más probable la presencia de otro alelo de resistencia.

Los resultados que hemos obtenido son acordes con los descritos por Glynn *et al.* (2013), quienes analizaron 485 variedades utilizadas como progenitores, encontrando que, de los clones clasificados fenotípicamente como resistentes, 154 (59 %) amplificaron el marcador *Bru1*, mientras que ninguno de los 100 clones susceptibles lo hizo. Por otro lado, Parco *et al.* (2014) analizaron 117 clones, de los cuales solo el 4,3 % portaban el marcador y mostraban resistencia.

4. Resultados y discusión

Cuadro 14. Comparación entre el genotipo (G) asociado al marcador *Bru1* de resistencia a roya marrón y el fenotipo (F) observado en 305 variedades de caña de azúcar. G=genotipo, F=fenotipo +=positivo para el alelo *Bru1*, - =negativo para el alelo *Bru1*, R=resistente, S=susceptible

No.	Variedad	G	F	No.	Variedad	G	F	No.	Variedad	G	F	No.	Variedad	G	F	No.	Variedad	G	F	No.	Variedad	G	F
1	B47258	+	R	52	CPCL02-0878	+	R	103	CG03-104	-	R	154	CP02-1334	-	R	205	CP86-1747	-	R	256	Mex68-2243	-	R
2	B4744	+	R	53	CPCL02-2584	+	R	104	CG03-114	-	R	155	CP02-1345	-	R	206	CP86-2024	-	R	257	My5464	-	R
3	B73375	+	R	54	Ja64-20	+	R	105	CG03-138	-	R	156	CP02-1593	-	R	207	CP87-1141	-	R	258	NA56-42	-	R
4	BA11569	+	R	55	Mex57-29	+	R	106	CG03-240	-	R	157	CP02-1703	-	R	208	CP87-1500	-	R	259	NA56-75	-	R
5	BJ5732	+	R	56	Mex57-473	+	R	107	CG03-242	-	R	158	CP02-1784	-	R	209	CP88-1165	-	R	260	P33-11	-	R
6	CB40-35	+	R	57	Mex60-445	+	R	108	CG03-256	-	R	159	CP02-1807	-	R	210	CP88-1179	-	R	261	PGM89-121	-	R
7	CG00-033	+	R	58	Mex69-290	+	R	109	CG95-107	-	R	160	CP02-1966	-	R	211	CP88-1532	-	R	262	POJ2878	-	R
8	CG02-064	+	R	59	Mex73-523	+	R	110	CG96-40	-	R	161	CP02-1969	-	R	212	CP88-1696	-	R	263	PPQK	-	R
9	CG02-064	+	R	60	Mex75-1705	+	R	111	CG96-78	-	R	162	CP02-2584	-	R	213	CP88-1700	-	R	264	PR61-632	-	R
10	CG03-025	+	R	61	Mex79-431	+	R	112	CG98-10	-	R	163	CP03-1002	-	R	214	CP88-1726	-	R	265	PR71-358	-	R
11	CG05-07344	+	R	62	Mex82-114	+	R	113	CG98-100	-	R	164	CP03-1494	-	R	215	CP88-1912	-	R	266	PR75-2002	-	R
12	CG99-099	+	R	63	PGM89-968	+	R	114	CG98-32	-	R	165	CP03-1553	-	R	216	CP88-2017	-	R	267	PR77-3031	-	R
13	CGCP95-53	+	R	64	POJ2714	+	R	115	CG98-46	-	R	166	CP03-1585	-	R	217	CP89-1288	-	R	268	PR78-3025	-	R
14	Co421	+	R	65	PR78-3012	+	R	116	CG98-62	-	R	167	CP03-1594	-	R	218	CP89-1325	-	R	269	PR87-2073	-	R
15	Co997	+	R	66	PR83-2046	+	R	117	CG98-78	-	R	168	CP03-1660	-	R	219	CP89-1327	-	R	270	PR87-2078	-	R
16	CP00-1570	+	R	67	PR87-2004	+	R	118	CG99-045	-	R	169	CP03-2212	-	R	220	CP89-1344	-	R	271	PR87-2080	-	R
17	CP00-1607	+	R	68	PR87-2015	+	R	119	CG99-048	-	R	170	CP04-1067	-	R	221	CP89-1417	-	R	272	Q107	-	R
18	CP00-1610	+	R	69	PR87-3025	+	R	120	CG99-087	-	R	171	CP04-119	-	R	222	CP89-1431	-	R	273	Q124	-	R
19	CP00-1830	+	R	70	PR99-7	+	R	121	CG99-125	-	R	172	CP04-1510	-	R	223	CP89-1436	-	R	274	Q96	-	R
20	CP00-2180	+	R	71	R570	+	R	122	CGCP95-50	-	R	173	CP04-2076	-	R	224	CP89-1528	-	R	275	RB73-2908	-	R
21	CP00-7753	+	R	72	RB732577	+	R	123	CGSP98-11	-	R	174	CP27-139	-	R	225	CP89-1538	-	R	276	SP71-6180	-	R
22	CP01-1338	+	R	73	RB845210	+	R	124	CGSP98-12	-	R	175	CP29-126	-	R	226	CP89-1551	-	R	277	SP79-1287	-	R
23	CP01-1614	+	R	74	RD75-11	+	R	125	CGSP98-16	-	R	176	CP48-103	-	R	227	CP89-1606	-	R	278	SP80-1842	-	R
24	CP01-1779	+	R	75	San Felipe	+	R	126	CL61-620	-	R	177	CP52-43	-	R	228	CP89-1632	-	R	279	SP81-3250	-	R
25	CP01-1802	+	R	76	SP70-4768	+	R	127	Co270	-	R	178	CP53-6	-	R	229	CP90-1204	-	R	280	SP83-2847	-	R
26	CP02-1668	+	R	77	SP79-2233	+	R	128	CP00-1071	-	R	179	CP63-588	-	R	230	CP90-1222	-	R	281	Tuc68-19	-	R
27	CP02-1756	+	R	78	Akoki	-	R	129	CP00-1100	-	R	180	CP65-357	-	R	231	CP90-1294	-	R	282	UCW5407	-	R
28	CP02-1769	+	R	79	B74-132	-	R	130	CP00-1101	-	R	181	CP67-42	-	R	232	CP91-1450	-	R	283	CG03-292	-	S
29	CP02-1840	+	R	80	C116-67	-	R	131	CP00-1359	-	R	182	CP70-321	-	R	233	CP91-1560	-	R	284	CG95-125	-	S
30	CP02-1915	+	R	81	C87-51	-	R	132	CP00-1675	-	R	183	CP72-1210	-	R	234	CP91-1564	-	R	285	CG96-01	-	S
31	CP02-2113	+	R	82	CB46-47	-	R	133	CP00-1683	-	R	184	CP72-1312	-	R	235	CP91-1941	-	R	286	CG96-135	-	S
32	CP03-1103	+	R	83	CC82-15	-	R	134	CP00-1748	-	R	185	CP73-1547	-	R	236	CP92-1185	-	R	287	CG96-42	-	S
33	CP03-1646	+	R	84	CC85-92	-	R	135	CP00-1749	-	R	186	CP75-1082	-	R	237	CP92-1682	-	R	288	CG96-52	-	S
34	CP03-1688	+	R	85	CG00-032	-	R	136	CP00-1751	-	R	187	CP75-1553	-	R	238	CP92-1780	-	R	289	CG97-100	-	S
35	CP03-1724	+	R	86	CG00-043	-	R	137	CP00-1758	-	R	188	CP76-328	-	R	239	CP93-1056	-	R	290	CG97-97	-	S
36	CP04-2115	+	R	87	CG00-092	-	R	138	CP00-1763	-	R	189	CP77-1055	-	R	240	CP96-1093	-	R	291	CG98-47	-	S
37	CP56-59	+	R	88	CG00-102	-	R	139	CP00-1803	-	R	190	CP78-1628	-	R	241	CP96-1552	-	R	292	CG99-007	-	S
38	CP62-374	+	R	89	CG00-111	-	R	140	CP00-1810	-	R	191	CP79-332	-	R	242	CP99-1989	-	R	293	CG99-023	-	S
39	CP66-346	+	R	90	CG00-120	-	R	141	CP00-1825	-	R	192	CP80-1743	-	R	243	CPCL02-1546	-	R	294	CGSP98-05	-	S
40	CP72-2086	+	R	91	CG00-129	-	R	142	CP00-2164	-	R	193	CP80-1752	-	R	244	CPCL02-2186	-	R	295	CGSP98-09	-	S
41	CP75-1632	+	R	92	CG01-17	-	R	143	CP01-1262	-	R	194	CP80-1827	-	R	245	CPCL05-1504	-	R	296	CP02-1003	-	S
42	CP78-1247	+	R	93	CG01-27	-	R	144	CP01-1372	-	R	195	CP81-1335	-	R	246	HoCP02-639	-	R	297	CP57-603	-	S
43	CP88-1508	+	R	94	CG01-52	-	R	145	CP01-1449	-	R	196	CP81-1383	-	R	247	IJ76-521	-	R	298	CP91-2087	-	S
44	CP89-2143	+	R	95	CG01-53	-	R	146	CP01-1750	-	R	197	CP82-2043	-	R	248	Ja64-19	-	R	299	Mex60-676	-	S
45	CP94-1182	+	R	96	CG01-60	-	R	147	CP01-2471	-	R	198	CP85-1482	-	R	249	L68-40	-	R	300	PR67-1355	-	S
46	CP96-1068	+	R	97	CG01-87	-	R	148	CP01-2634	-	R	199	CP86-1209	-	R	250	L77-40	-	R	301	PR87-2048	-	S
47	CP96-1120	+	R	98	CG02-007	-	R	149	CP02-1049	-	R	200	CP86-1614	-	R	251	L80-38	-	R	302	RB72-1012	-	S
48	CP97-1931	+	R	99	CG02-144	-	R	150	CP02-1050	-	R	201	CP86-1623	-	R	252	LM2002	-	R	303	SP71-6161	-	S
49	CP98-1029	+	R	100	CG02-163	-	R	151	CP02-1120	-	R	202	CP86-1633	-	R	253	Mex53-142	-	R				
50	CP99-1944	+	R	101	CG03-047	-	R	152	CP02-1124	-	R	203	CP86-1664	-	R	254	Mex57-683	-	R				
51	CPCL00-6131	+	R	102	CG03-098	-	R	153	CP02-1255	-	R	204	CP86-1705	-	R	255	Mex58-326	-	R				

4.3 Obtención de híbridos de interés en la mejora genética de caña de azúcar e identificación de cruas superiores mediante evaluación de familias F₁

Los coeficientes de similitud que se obtuvieron en el apartado anterior mediante el análisis de marcadores moleculares nos han servido para diseñar nuevas cruas que incrementen la variabilidad genética que como hemos comentado en estos híbridos

cultivados no es muy elevada. La información obtenida con el marcador de resistencia a roya marrón nos permite también diseñar cruzas que produzcan progenies que muestren resistencia a esta enfermedad. Puesto que con las nuevas variedades se busca aumentar el rendimiento de azúcar por hectárea, se debe tener presente que este objetivo se puede lograr por dos vías distintas, la primera es aumentando el contenido de azúcar en los tallos y la segunda, aumentando la biomasa (toneladas de caña por hectárea) y de manera indirecta pero de gran importancia, aumentando la tolerancia o resistencia a las distintas enfermedades. Es por ello que se han evaluado distintos parámetros relacionados: brix (%), altura de planta, diámetro tallo, número de tallos y el comportamiento de estas plantas frente a las enfermedades más comunes, de suma importancia para conseguir buenos rendimientos.

Obtención de nuevos híbridos y caracterización preliminar

El coeficiente de similitud en las cruzas realizadas en el año 2012 (Cuadro 15) varió entre 0,500 y 0,750 y el rango de variación fue de 0,462 y 0,694 en las cruzas realizadas en el año 2013 (Cuadro 16). De entre los parentales seleccionados para obtener nuevos híbridos en 2012 e iniciar su caracterización el siguiente año, los genotipos PR87-2015, CP89-2143, CP72-2086 y SP79-2233 amplificaron el marcador asociado al alelo *Bru1*. Las evaluaciones de familias en plantía (2013) y primera soca (2014) fueron realizadas en la localidad de Camantulul y se compararon con los resultados de la variedad más utilizada, CP72-2086, resistente a la roya marrón, carbón y escaldadura foliar pero susceptible a roya naranja, virus del mosaico y virus de la hoja amarilla.

Con relación a incidencia a las distintas enfermedades, para la roya marrón las familias evaluadas se mostraron tan resistentes como la variedad control que porta el alelo *Bru1*, pues con excepción de la crusa 1 (cuyos parentales no amplificaron este alelo) con 3 % de plantas infectadas, ninguna crusa mostró incidencia de la enfermedad. Cabe recordar la posible presencia de otro alelo de resistencia en los genotipos utilizados como parentales.

4. Resultados y discusión

Cuadro 15. Progenitores seleccionados y medias de las progenies en el ensayo de evaluación de familias, Camantulul 2013-2014.

No. Cruza	Progenitor femenino	Progenitor masculino	Coefficiente de Similitud	Número de plantas P ^a	Número de plantas 1S	Brix (%) P	Altura (m) P	Diametro (cm) P	Tallos/10m P	Carbón (%) ^b P	Carbón (%) 1S	Escaldadura (%) P	Escaldadura (%) 1S	Virus Mosaico (%) P	Virus Mosaico (%) 1S	Roya Naranja (%) P	Roya Naranja (%) 1S	Roya Marrón (%) P	Roya Marrón (%) 1S	SCYLV ^c (%) P	SCYLV (%) 1S
1	CP73-1547	CP00-1359	0.667	30	25	21.0	2.01	2.49	50	0	0	0	2	5	2	31	16	3	0	3	3
2	CP73-1547	SP79-2233*	0.500	27	23	20.0	2.28	2.33	70	0	0	0	0	41	33	64	43	0	0	9	9
3	CP73-1547	CG98-46	0.571	16	12	20.5	2.04	2.81	30	0	0	0	0	7	2	19	10	0	0	2	9
4	CP02-1807	CP00-2164	0.667	31	26	22.0	2.06	1.98	60	0	0	0	2	17	5	28	14	0	0	3	12
5	CP02-1807	CP01-2471	0.558	31	29	23.3	2.36	2.43	80	0	0	0	0	2	2	19	21	0	0	5	16
6	PR87-2015*	CP86-2024	0.640	26	23	20.5	2.27	2.53	50	0	0	0	0	3	3	22	12	0	0	5	17
7	CP89-2143*	CC85-92	0.679	28	26	22.0	2.22	2.72	50	0	0	0	0	22	7	36	28	0	0	12	12
8	CP89-2143*	CP72-2086*	0.750	24	24	23.5	2.17	2.43	70	0	0	0	0	43	17	24	26	0	0	7	12
PROMEDIO			0.629	27	24	21.6	2.18	2.46	58	0	0	0	0	18	9	30	21	0	0	6	11
CP72-2086* (Control)				30	30	21.0	2.29	2.23	100	0	0	0	0	79	45	47	100	0	0	9	64

^aP=Plantía (2013) y 1S=Primera soca (2014), ^bSe refiere al porcentaje de plantas dentro de la familia que mostró síntomas de la enfermedad, ^cVirus del Amarillamiento Foliar (Sugar Cane Yellow Leaf Virus)

*Amplificó el alelo *Bru1* de resistencia a Roya Marrón

El porcentaje de plantas con síntomas de las enfermedades conocidas como escaldadura y carbón fue muy bajo en la primera evaluación (0-2 %) o nulo en la segunda. Sin embargo, todas las familias evaluadas presentaron incidencia de virus del mosaico en diferentes niveles, 18 y 9 % en plantía y primera soca, respectivamente, pero menores a los mostrados por la variedad control con 45 y 79 % para plantía y primera soca, también respectivamente, siendo las familias de las cruzas 1, 5, y 6 las que mostraron niveles menores entre 0 y 7 %. De igual forma, con relación a roya naranja, todas las familias mostraron infección, 30 y 21 % en plantía y primera soca, respectivamente, pero en menor grado que la variedad control, con 47 y 100 %, siendo la cruz 3 la que mostró niveles menores de infección entre 19 y 10 % en plantía y primera soca, respectivamente. La mayor incidencia de roya naranja puede deberse a que el mejoramiento para resistencia a esta enfermedad apenas se está iniciando, pues recién se detectó en el año 2007 en la variedad control (Ovalle *et al.*, 2008), lo que provocó una disminución en su área de siembra. Las plantas obtenidas de estas cruzas también mostraron bajos porcentajes de plantas infectadas con el virus del mosaico y el SCYLIV. Ninguna familia resultó ser inmune al virus de la hoja amarilla, que tuvo una mayor incidencia en 2014 con un promedio de plantas infectadas del 11 % pero menor que la variedad control con 64 %. La variabilidad obtenida en las familias con relación al brix, que representa el porcentaje de azúcares contenidos en el jugo de la caña de azúcar, fue baja como era de esperarse en cruzas entre variedades nobilizadas, sin embargo, los valores obtenidos fueron altos en el rango de 20-23,5 %, siendo este último valor el correspondiente a la cruz 8 (CP89-2143 x CP72-2086) con un coeficiente de similitud alto de 0,75 entre los progenitores, seguido de 23,3 % del cruzamiento 5 (CP02-1807 x CP01-2471) con un coeficiente de similitud comparativamente bajo de 0,558. Se esperaría que las variedades derivadas de ellos tengan más contenido de azúcar en sus tallos que las variedades de las demás cruzas e incluso la variedad control. Estos datos confirman la aseveración de Jackson (2005) respecto a que el contenido de azúcar en la caña es un carácter aditivo que no depende de la expresión heterótica como depende en efecto, el rendimiento de caña (biomasa). El rendimiento de caña está a su vez relacionado con los parámetros de altura de planta, diámetro del tallo y población de tallos por

metro lineal, por lo que se espera que las variedades derivadas de la cruz 5 cuyos progenitores mostraron un coeficiente de similitud de 0,558 tengan mayor rendimiento de caña con relación a las progenies de las demás cruas pero no que la variedad control, pues presentan la mayor altura de planta (2,36 m), el mayor diámetro de tallo (2,43 cm) y la mayor población de tallos (80/10m).

En este grupo de cruas, la variedad CP73-1547 se usó como parental femenino con tres diferentes parentales masculinos, CP00-1359, SP79-2233 y CG98-46 encontrándose valores de brix similares en los tres casos (entre 20 y 21 %), no obstante, con el segundo parental masculino las progenies se mostraron más susceptibles a virus del mosaico, roya marrón, roya naranja y SCYLV. La variedad CP02-1807 por su parte, se usó como parental femenino en dos ocasiones con parentales masculinos diferentes, CP00-2164 y CP01-2471, siendo la familia del segundo cruce la que mostró mayor contenido de azúcar en los tallos (23,3 %) en comparación con el primero (22,0 %). Ambos cruces mostraron similitud en la incidencia de enfermedades con excepción de virus del mosaico que se mostró menor con el segundo parental. También la variedad CP89-2143 se usó como progenitor femenino en dos ocasiones con progenitores masculinos diferentes, CC85-92 y CP72-2086, siendo la familia del segundo la que presentó mayor brix (23,5 %) en comparación con el primero (22,0 %) pero también mostró mayor incidencia de virus del mosaico.

En el Cuadro 16 se muestran las 14 familias obtenidas cuya caracterización se realizó durante 2014 en plantía y 2015 en primera soca. Dentro de este grupo de parentales las variedades CP97-1931, CG03-025, Mex79-431, CP00-1570, CP00-1830, CPCL02-0878 y CP72-2086 amplificaron el alelo *Bru1* de resistencia a roya marrón, igual que la variedad control. En este caso no se observaron síntomas de la enfermedad en ninguna de las familias.

4. Resultados y discusión

Cuadro 16. Progenitores seleccionados y medias de las progenies en el ensayo de evaluación de familias, Camantulul, 2014-2015.

No. Cruza	Progenitor femenino	Progenitor masculino	Coefficiente de Similitud	Número de plantas P ^a	Número de plantas 1S	Brix (%) P ^a	Altura (m) P	Diámetro (cm) P	Tallos/10m	Carbón (%) ^b P	Carbón (%) 1S	Escaldadura (%) P	Escaldadura (%) 1S	Virus Mosaico (%) P	Virus Mosaico (%) 1S	Roya Naranja (%) P	Roya Naranja (%) 1S	Roya Marrón (%) P	Roya Marrón (%) 1S	SCYLV ^c (%) P	SCYLV (%) 1S
1	CP00-1675	CC85-92	0,561	21	23	20,6	1,96	2,4	60	0	0	0	0	25	7	34	9	0	0	5	5
2	CP97-1931*	CG03-025*	0,607	30	24	24,8	2,26	2,3	91	0	0	0	0	16	5	61	23	0	0	9	5
3	CP97-1931*	CC85-92	0,679	26	22	21,5	1,91	2,8	61	0	0	0	0	7	13	21	9	0	0	5	5
4	CP52-43	CG03-025*	0,644	20	18	24,1	2,09	2,6	32	0	0	0	0	25	18	36	16	0	0	2	2
5	CP73-1547	Mex79-431*	0,462	29	24	22,8	1,64	2,2	61	0	0	0	0	41	16	36	16	0	0	9	0
6	CP73-1547	CC85-92	0,556	18	23	24,0	2,00	2,6	68	0	0	0	2	9	7	30	21	0	0	11	2
7	CP73-1547	CG03-025*	0,556	27	24	21,4	1,70	2,5	55	0	0	0	0	9	7	52	25	0	0	16	2
8	CPCL02-1546	CG98-78	0,549	27	24	22,8	2,49	2,7	64	0	0	0	0	7	2	23	14	0	0	4	2
9	CG00-102	CP80-1743	0,632	18	8	24,1	1,80	2,4	52	0	0	0	0	2	0	18	11	0	0	4	0
10	CP00-1830*	CG98-78	0,519	26	11	22,4	1,83	2,1	43	0	0	0	0	52	16	50	14	0	0	9	7
11	CPCL02-0878*	CP00-1570*	0,462	24	16	21,9	1,85	2,5	39	0	0	0	0	23	4	27	16	0	0	0	2
12	CG98-10	CC85-92	0,632	24	23	22,8	2,01	2,7	51	0	0	0	0	21	20	52	38	0	0	9	2
13	CP72-2086*	CG98-46	0,615	25	19	21,5	2,15	2,3	73	0	0	0	0	38	13	39	16	0	0	5	2
14	CP72-2086*	CG98-78	0,694	31	21	23,3	2,13	2,8	70	0	0	0	0	16	0	50	23	0	0	13	0
PROMEDIO			0,583	25	20	22,7	1,99	2,5	59	0	0	0	0,1	21	9	38	18	0	0	7	3
CP72-2086* (Control)				26	25	21,8	2,30	2,7	82	0	0	0	0	14	4	82	50	9	0	7	4

^aP=Plantía (2013) y 1S=Primera soca (2014), ^bSe refiere al porcentaje de plantas dentro de la familia que mostró síntomas de la enfermedad, ^cVirus del Amarillamiento Foliar (Sugar Cane Yellow Leaf Virus)

*Amplificó el alelo *Bru1* de resistencia a Roya Marrón

Ninguna de las familias evaluadas mostró incidencia de roya marrón en ninguno de los dos años de evaluación y lo mismo se observó para las enfermedades conocidas como carbón y escaldadura foliar. Para esta última, la cruza 6 fue la única que mostró una incidencia de 2 % en la primera soca. Como sucedió en las familias evaluadas anteriormente, la roya naranja tuvo altos niveles de incidencia, no obstante, los niveles que presentaron las familias, fueron menores a los niveles de la variedad control, tanto en plantía (37 % promedio para las cruzas y 82 % para el control), como en primera soca (18 % promedio de las cruzas y 50 % la variedad control). Las familias de la cruza 3 (CP97-1931 x CC85-92) y cruza 10 (CP00-102 x CP80-1743) presentaron la menor incidencia a esta enfermedad con un rango de incidencia entre 9 y 21 %. El virus del mosaico también tuvo incidencia en todas las familias y la variedad control, siendo mayor el promedio de incidencia de las familias, 20 % y 9 % en plantía y primera soca, respectivamente que la variedad control, 14 % y 4 % respectivamente. Con relación al virus de la hoja amarilla, el promedio de incidencia en las familias en plantía fue igual que en la variedad control (7 %) y menor en primera soca (3 % promedio de las familias y 4 % del control).

La variación con respecto al Brix en las familias estuvo entre 20,6-24,8 %, con un promedio de 22.6 %, superior a la variedad control que tuvo 21,8 %. La cruza 2 (CP97-1931 x CG03-025) mostró el valor más alto de Brix (24,8 %), seguido de las cruzas 4 (CP52-43 x CG03-025) y 6 (CP73-1547 x CC85-92) con Brix 24,1 % y 24,0 %, respectivamente. En cuanto a los parámetros altura de planta, diámetro de tallo y número de tallos/10 m, los promedios de las familias evaluadas no superan a la variedad control. Estos resultados apoyan los obtenidos por Jackson (2005) quien encontró que existe una relación inversa entre el contenido de azúcar y el rendimiento de caña.

La variedad CP97-1931 se utilizó como progenitor femenino en dos ocasiones con diferente progenitor masculino, CG03-025 en el primer caso y CC85-92 en el segundo. La primera combinación resultó en mayor Brix, 24,8 % contra 21,5 % en la segunda, pero la incidencia de enfermedades fue menor en esta última. Por otra parte, la variedad CP73-1547 se utilizó como progenitor femenino en tres cruzas

con diferentes progenitores masculinos, Mex79-431, CC85-92 y CG03-025. La segunda combinación mostró el brix más alto, 24 % en comparación con 22,8 y 21,4 % de la primera y tercera, respectivamente. La incidencia de virus del mosaico fue mayor en la primera combinación 16-41 % comparado con 7-9 % que mostraron las otras dos, sin embargo, la incidencia de roya naranja fue alta en los tres casos con una variación entre 16-52 %. Por último, la variedad CP72-2086 se utilizó como parental femenino en dos ocasiones con las variedades CG98-46 y CG98-78 como parentales masculinos, en este caso, la segunda combinación mostró mayor Brix, 23,3 % mientras que la primera registró 21,5 %, esta última mostró mayor incidencia de virus del mosaico 13-38 % pero menor incidencia de roya naranja 16-39 % y virus del Amarillamiento 2-5 %.

En el conjunto de cruzamientos, el genotipo CP73-1547 se ha combinado con 6 genotipos utilizándolo como parental femenino. De estos cruces se han obtenido diferencias notables en cuanto al Brix, altura de planta, diámetro de tallo, número de tallos e incidencia de enfermedades. En ambos grupos de cruces, el promedio de Brix en todas las familias fue superior al Brix de la variedad control, mientras que en parámetros como altura de planta, diámetro de tallo y número de tallos los promedios de las familias fueron inferiores, por lo que es de esperarse que en estas progenies, el aumento en el rendimiento de azúcar venga del contenido de azúcar en los tallos, representado por el Brix y no por el rendimiento de caña.

4.4 Diagnóstico, caracterización y prospección de *Xanthomonas albilineans* y virus del Amarillamiento de la Caña de Azúcar en distintas zonas de cultivo de caña de Guatemala. Evaluación de metodologías para saneamiento de materiales infectados.

El control de *X. albilineans* y del virus de la hoja amarilla de la Caña de Azúcar (SCYLV) es de vital interés para la obtención de buenos rendimientos en este cultivo y evitar la propagación de estas enfermedades. El control más eficiente para hacer frente a distintos patógenos recae en la utilización de resistencia genética de las variedades. La otra metodología de control es el desarrollo de semilleros libres de

enfermedades, que se consiguen a través del uso de tratamientos térmicos, productos fitosanitarios y monitoreo constante. Este último se basa en la evaluación fenotípica, siempre dificultosa y con la identificación en numerosas ocasiones de falsos negativos. Con esta situación se consideró de interés la comparación de distintos métodos de control en semilleros y el desarrollo de protocolos de cultivo de meristemas para el saneamiento de materiales de interés a la vez que el desarrollo de métodos confiables que permitan la detección de infecciones latentes como sucede comúnmente con los patógenos *X. albilineans* y SCYLV.

4.4.1 Diagnóstico y prospección de las enfermedades de la escaldadura foliar y la causada por el virus del amarillamiento en zonas de cultivo de caña en Guatemala.

Se consideró de interés realizar una prospección aleatoria para determinar la presencia de estas enfermedades en distintas áreas de cultivo utilizando metodologías más precisas que la mera observación fenotípica de los síntomas. Para ello se compararon en primer lugar dos metodologías que nos permitieran determinar la presencia del patógeno causante de escaldadura foliar, la bacteria *X. albilineans* y para determinar la presencia de SCYLV se utilizó análisis de ARN vírico en las plantas muestreadas.

4.4.2 Diagnóstico y prospección de *Xanthomonas albilineans*

Comparación de dos metodologías de diagnóstico

Se compararon para diagnosticar la presencia de *X. albilineans* dos metodologías: análisis por PCR y DBIA (Dot Blot Immunoassay) en 39 tallos que mostraban síntomas visuales de escaldadura foliar. La amplificación PCR fue la más eficiente para confirmar la presencia de *X. albilineans* (Figura 16), resultado que era esperable por ser la PCR una técnica que permite amplificar a partir de un escaso

número de moléculas. La comparación con el método DBIA, sin embargo, nos pareció de interés ya que es más sencillo y rápido y había sido reportado como igual de eficiente para el diagnóstico de este patógeno (Pan *et al.* 1997). Estos autores determinaron la presencia de *X. albilineans* en 15 de 16 muestras sintomáticas (93,75 %), con ambos métodos. En nuestro estudio aunque la PCR ha resultado en promedio más adecuada también se confirma el resultado obtenido por estos autores ya que en la localidad de Camantulul se ha obtenido el mismo resultado.

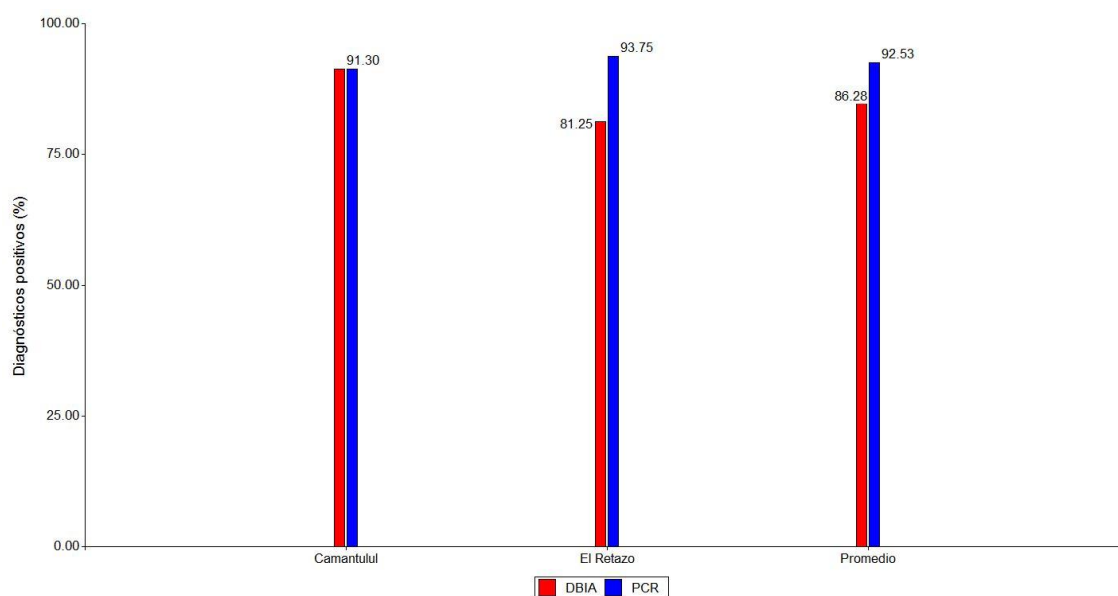


Figura 16. Porcentaje de diagnósticos positivos de *X. albilineans* en 39 tallos con síntomas, 23 provenientes de la Estación Experimental Camantulul y 16 de finca El Retazo, utilizando dos métodos de diagnóstico, DBIA y PCR.

Prospección

Se procedió posteriormente a la prospección de *X. albilineans* en 56 lotes de la zona cañera utilizando la metodología PCR. Un lote es el área básica de producción de un ingenio. Su tamaño es variable, regularmente entre 10-25 hectáreas y se define con base en los linderos existentes, acceso a agua y topografía entre otros factores. En el cuadro 17 se pueden observar los números de identificación de los lotes que fueron muestreados para la prospección de los patógenos y los resultados de los diagnósticos de la prospección para *X. albilineans*. También en la Figura 17 se muestra un gel de electroforesis con el

resultado obtenido para una muestra de las variedades analizadas por PCR y, en la Figura 18, se muestra la ubicación del muestreo señalizando con puntos rojos las plantas infectadas. La distribución dispersa de aquellas áreas con materiales infectados puede ser debida a que este patógeno no se transmite a través de áfidos como vectores, sino más bien, a través de material e instrumentos contaminados. (Comstock y Gilbert, 1991).

Puede observarse que solamente 4 de los 56 lotes (7 %) presentaron plantas infectadas. Las variedades en las cuales se encontró *X. albilineans* fueron CP73-1547, CP72-2086 (2 lotes) y RB73-2577. La primera de estas variedades es conocida por ser susceptible al patógeno, sin embargo, las otras dos eran consideradas resistentes (entendida la resistencia como la no manifestación de síntomas). Como hemos podido apreciar, la infección puede ocurrir y estar latente, lo cual dificulta un diagnóstico preciso y la determinación de su incidencia (Comstock y Irey, 1992), de ahí la importancia de contar con métodos de diagnóstico más eficientes que la observación visual.

4. Resultados y discusión

Cuadro 17. Listado de lotes y variedades muestreados en la prospección de *Xanthomonas albilineans* y virus del Amarillamiento de la Caña de Azúcar.

No.	Variedad	Código Lote	Diagnóstico		No.	Variedad	Código Lote	Diagnóstico	
			X. alb	SCYLV				X.alb	SCYLV
1	NA 56-42	80702	-	+	29	CG 98-10	0091103	-	-
2	CG 98-10	80301	-	+	30	CG 98-10	0090802	-	-
3	CG 98-10	940701	-	+	31	CG 98-10	0091701	-	-
4	CG 98-10	81003	-	+	32	NA 56-42	0090803	-	-
5	CG 98-10	940401	-	+	33	CG 98-10	0091702	-	+
6	CG 98-10	940801	-	+	34	NA 56-42	0091502	-	-
7	CP 88-1165	81302	-	+	35	MEX 79-431	0091501	-	+
8	CG 98-10	940101	-	+	36	var repro.	0090301	-	-
9	CG 98-10	940901	-	-	37	PR 61-632	0090401	-	-
10	CG 98-10	180108	-	-	38	CG 98-10	0090902	-	-
11	MEX 79-431	180104	-	-	39	CG 98-10	0090801	-	-
12	NA 56-42	80901	-	-	40	MEX 79-431	0091003	-	-
13	MEX 79-431	180105	-	+	41	RB73-257	0950306	-	-
14	CG 98-10	80801	-	-	42	CG 98-10	0930601	-	-
15	CG 98-10	81101	-	+	43	RB73-257	0950206	-	+
16	MEX 79-431	81202	-	+	44	CP72-2086	0930301	-	-
17	MEX 79-431	180106	-	+	45	CP88-1165	0950204	-	-
18	CG 98-10	80302	-	+	46	MT06-004	0950305	-	-
19	CG 98-10	940201	-	+	47	RB73-257	0950205	-	-
20	MEX 79-431	180101	-	-	48	CP72-2086	0950101	-	-
21	CG 98-10	80701	-	-	49	CP72-2086	0930501	-	-
22	CG 98-10	81001	-	-	50	RB73-257	0950301	-	-
23	MEX 79-431	180107	-	+	51	CP72-2086	0950301	-	-
24	NA 56-42	81002	-	+	52	CP72-2086	0950208	-	-
25	NA 56-42	81202	-	+	53	CP72-2086	0950302	+	-
26	CG 98-10	941001	-	+	54	RB73-257	0950303	+	-
27	CG 98-10	940501	-	+	55	CP72-2086	0930201	+	-
28	CG 98-10	0090901	-	+	56	CP73-1547	0130203	+	-

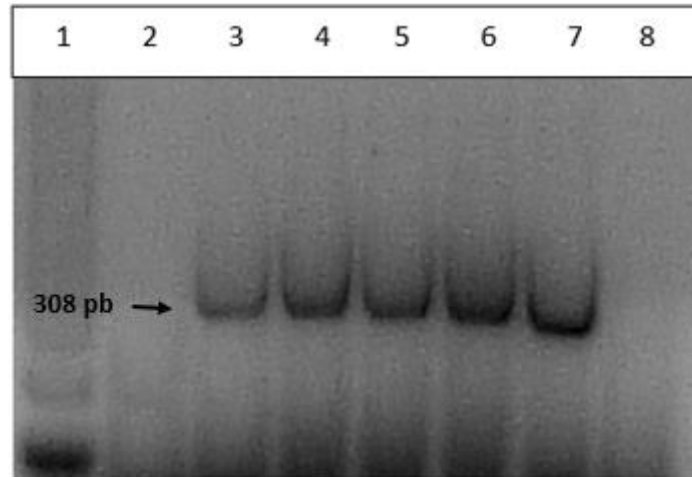


Figura 17. Gel de electroforesis mostrando la banda de 308 pb que identifica la presencia de *X. albilineans*. Carriles 1= escalera 100 pb, 2= control negativo, 3= control positivo, 4= CP72-2086 muestra 53 según cuadro 16, 5= RB73-2257 muestra 54, 6= CP72-2086 muestra 55, 7= CP73-1547 muestra 56, 8= CP72-2086 muestra 52.



Figura 18. Mapa de la zona cañera que muestra los 56 lotes muestreados para escaldadura foliar. Los puntos verdes indican ausencia de la enfermedad y los rojos indican presencia.

4.4.3 Caracterización de cepas de *Xanthomonas albilineans* con base en secuencias genómicas

Se tomaron 23 muestras de producto de PCR de igual número de tallos que se diagnosticaron positivos para *X. albilineans* de acuerdo con la sección 3.2 y se

secuenciaron. Tras la secuenciación de un fragmento del gen de la albicidina, las secuencias se alinearon para encontrar una secuencia consenso. El alineamiento de todas las secuencias obtenidas en las muestras, permitió la identificación de una secuencia consenso de 289 pb y la existencia de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) como se presenta en la Figura 19.

```

Xa12    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 60
Xa25    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 121
Xa08    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 160
Xa01    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 155
Xa02    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 152
Xa03    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 160
Xa22    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 60
Xa04    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 174
Xa05    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 174
Xa07    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 174
Xa09    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 162
Xa17    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCGCATAATGAAG 174
Xa23    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 63
Xa13    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 160
Xa06    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 174
Xa10    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 174
Xa11    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 174
Xa14    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 174
Xa15    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 240
Xa18    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 174
Xa19    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 174
Xa20    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 240
Xa24    ATTGCGCCTCGGCAGTCGTCGGATCGATCAGCACGCTCGCCGCACCAACATAATGAAG 174
*****

```

Figura 19. Polimorfismo A/G identificado en las muestras de *X. albilineans* de 23 muestras recolectadas en tres localidades diferentes de la zona cañera de Guatemala

Al comparar las secuencias de las muestras del presente estudio con las tres secuencias de *X. albilineans* disponibles en el GeneBank, una correspondiente a la cepa identificada como AJ586576.1 de Florida, EUA, la segunda identificada como JF699512 de Brasil y la tercera identificada como FP565176.1 de Guadalupe, se identificó un SNP con las variantes A-G antes descrito, en el que la variante G tiene una coincidencia de 100% con la cepa de Florida, mientras que la variante A coincide en 99% con las cepas de Brasil y Guadalupe. Se desconoce si existe efecto sobre el fenotipo de las variantes.

4.4.4 Diagnóstico y prospección de virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar

Para diagnosticar la presencia de SCYLV se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR). Para ello se colectaron 60 tallos con síntomas visuales del virus, 31 provenientes de la Estación Experimental Camantulul, de los cuales 29 dieron positivo en el diagnóstico (93,55 %) y 29 de la finca El Retazo, de los cuales 22 dieron positivo (75,86 %). En promedio, se detectó SCYLV en 84,70 % de las muestras. Estos tallos fueron utilizados en la evaluación de tratamientos para el saneamiento de materiales infectados. Las muestras con síntomas que no amplificaron el virus podrían estar afectadas por el fitoplasma del amarillamiento o mostrar síntomas debido a un desbalance nutricional.

Esta metodología fue utilizada también en la prospección de SCYLV como se muestra en la Figura 20. Los resultados de la prospección de SCYLV en 56 lotes (Cuadro 17) y su distribución en la zona cañera de Guatemala pueden observarse en la Figura 22. De los 56 lotes evaluados, 23 presentaron plantas infectadas (40,35 %). Esta alta incidencia probablemente se debe a que este virus se transmite a través de áfidos, además de cuando se utiliza semilla vegetativa infectada (Joomun y Dookum-Saumtally, 2010). Entre las variedades infectadas están NA56-42, CG98-10, Mex79-431 y RB73-2577, cuya susceptibilidad ya había sido observada con anterioridad. Como puede observarse en la Figura 21, existe una alta incidencia en la zona alta (arriba de 300 msnm), lo cual confirma lo señalado por CENGICANÑA (2012) sobre una asociación entre temperaturas bajas y mayor severidad, por lo cual ciertas variedades muestran problemas con la enfermedad en zonas altas y no en zonas bajas.

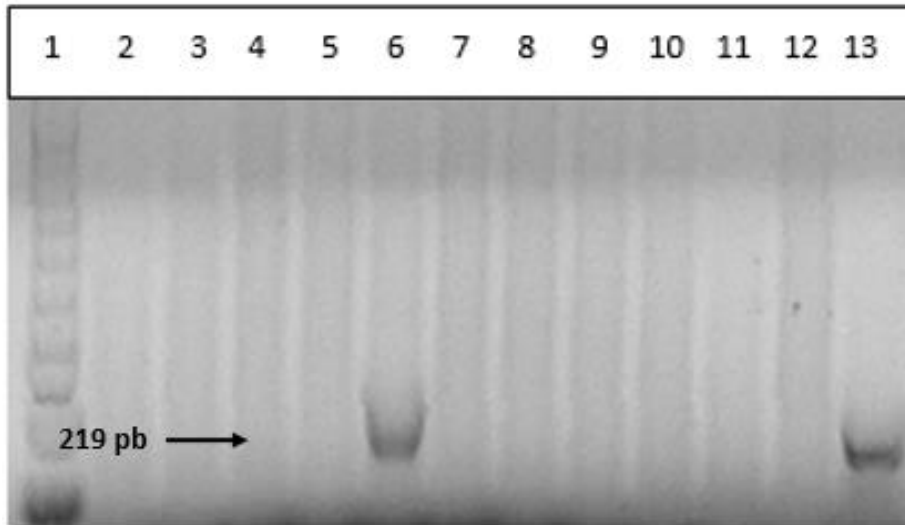


Figura 20. Gel de electroforesis mostrando la banda de 219 pb que identifica la presencia de SCYLIV. Carriles 1= escalera 100 pb, 2= control negativo, 3-12= muestras 40-33 según cuadro 16, 13= control positivo.

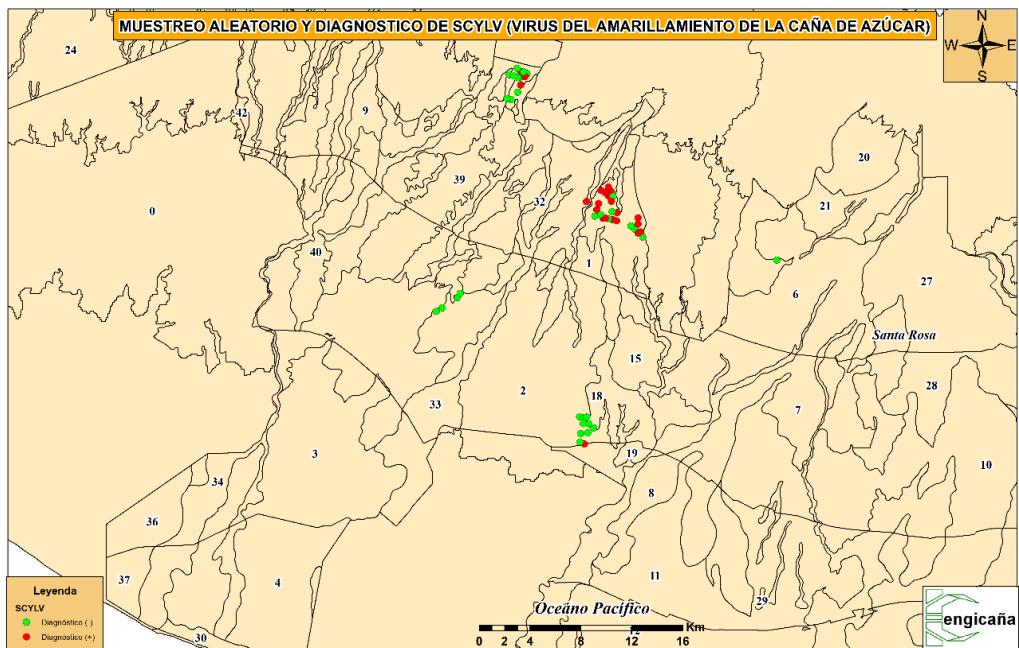


Figura 21. Mapa de la zona cañera que muestra los 57 lotes monitoreados para virus del amarillamiento. Los puntos verdes indican ausencia de la enfermedad y los rojos indican presencia.

4.4.5 Saneamiento de material vegetal

Se ha realizado un estudio para comparar el tratamiento habitual de inmersión en agua a 50°C durante 3 horas (Comstock y Gilbert, 1991; Chatenet et al., 2001) para la eliminación de *X. albilineans* y SCYLV, así como otros combinados con el cultivo de meristemas, con el fin de determinar la metodología más eficiente para obtener material de iniciación sano. Para ello se utilizaron tallos cuya infección con *X. albilineans* fue verificada mediante PCR (sección 4.3.2) y tallos cuya infección con SCYLV fue verificada mediante RT-PCR (sección 4.3.4). De acuerdo a Comstock y Gilbert (1991), el uso de semilla vegetativa libre de enfermedades proveniente de cultivo de tejidos es otra medida efectiva para el control de *X. albilineans*. Burbano y Garcés (2007) lograron eliminar SCYLV en 92,3 % de las plantas regeneradas de meristemas apicales previo tratamiento térmico.

En este estudio se han comparado distintos tratamientos térmicos combinados o no con cultivo de meristemas para determinar el más eficiente en nuestros materiales. Puesto que estos tratamientos pueden afectar la capacidad de brotación o regeneración de los meristemas se ha estudiado en primer lugar cómo afectan a estos factores los distintos tratamientos.

Efecto de la temperatura en la capacidad de brotación de las yemas y regeneración de los meristemas

En primer lugar se ha evaluado cómo afectan los tratamientos térmicos (estufa a 40°C durante 10 días, la inmersión a 50°C durante 1 o 3 h) al porcentaje de brotación de las yemas sometidas a los mismos en comparación con el control (sin tratamiento). Los porcentajes de brotación de las yemas sometidas a estos tratamientos variaron entre 89,5 (control) y 40,5. La brotación en estufa a 40°C, no afecta la posterior brotación de las yemas pero los tratamientos hidrotérmicos disminuyen el porcentaje de brotación en más del 50 % (Figura 22). Ramgareeb *et al.* (2010) no encontraron diferencias en la brotación de yemas entre el tratamiento control y la inmersión en agua caliente a 50°C durante 40 minutos, lo que sugiere que el tiempo de inmersión puede ser el

causante del efecto, en nuestro estudio el tiempo utilizado ha sido superior (1 h y 3 h).

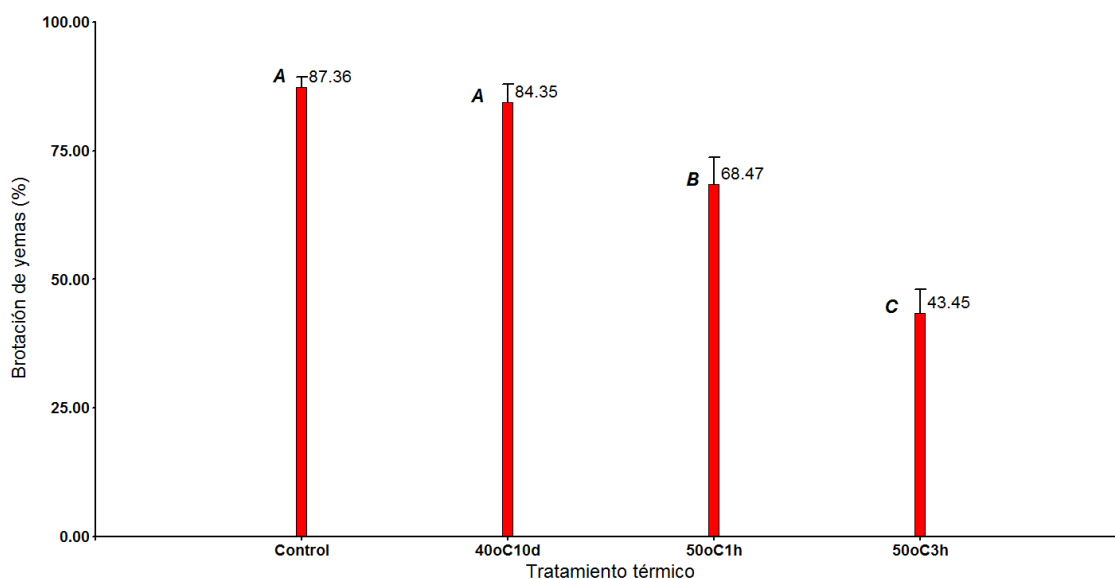


Figura 22. Porcentaje de brotación de yemas de acuerdo con el tratamiento térmico aplicado. Sin T=sin tratamiento térmico, 40oC10d=40°C durante 10 días, 50oC1h=50°C durante 1 hora, 50oC3h=50°C durante 3 horas

También se evaluó la capacidad de regeneración de los meristemos en las plantas tratadas con termoterapia, comprobándose que los meristemos obtenidos a partir de yemas brotadas regeneraban en porcentajes similares a los obtenidos de las plantas no tratadas (Figura 23) En promedio se obtuvo regeneración el 55,3 % de los meristemos. Este porcentaje refleja la dificultad para obtener meristemos en caña de azúcar. Los daños que se efectúan en la extracción del meristemo son probablemente los causantes de estos porcentajes de regeneración.

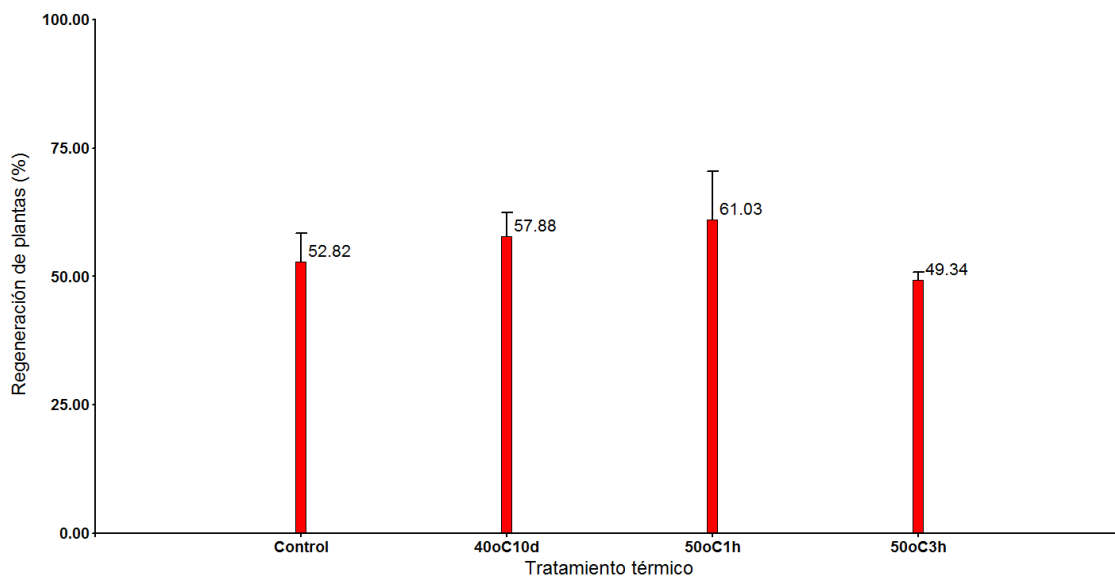


Figura 23. Porcentaje de regeneración de plantas por cultivo de meristemos de acuerdo con el tratamiento térmico aplicado. Sin T=sin tratamiento térmico, 40oC10d=40°C durante 10 días, 50oC1h=50°C durante 1 hora, 50oC3h=50°C durante 3 horas

4.4.6 Saneamiento de plantas infectadas con *X. albilineans*

El análisis de las plantas brotadas directamente de las yemas termotrataadas y de los meristemos obtenidos de estas indican que el cultivo de meristemos es efectivo para obtener plantas libres de *X. albilineans* sin necesidad de realizar tratamientos térmicos (Figura 24). Por otra parte, los porcentajes de planta saneada obtenidos en los tratamientos que combinan termoterapia o hidroterapia no superan a los obtenidos a partir de meristemos no tratados por lo que se recomienda utilizar directamente este tratamiento.

4. Resultados y discusión

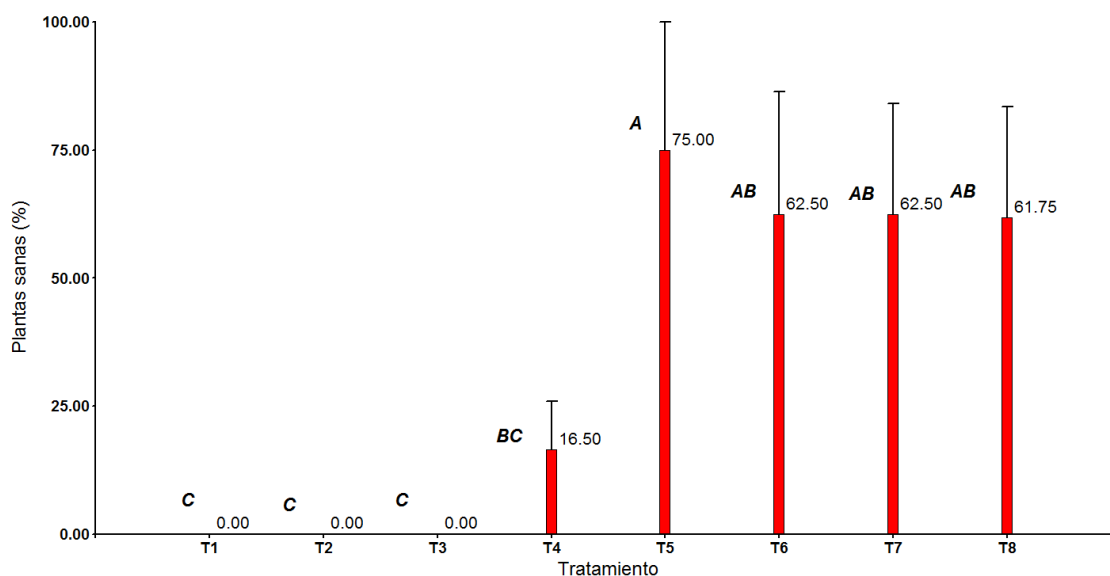


Figura 24. Porcentaje de plantas libres de *X. albilineans* luego de la aplicación de los tratamientos térmicos con y sin cultivo de meristemos. T1= control, T2= horno a 40°C durante 10 días, T3= inmersión en agua a 51°C durante 1 hora, T4= inmersión en agua a 50°C durante 3 horas, T5= cultivo de meristemos, T6= horno a 40°C durante 10 días + cultivo de meristemos, T7= inmersión en agua a 51°C durante 1 hora + cultivo de meristemos, T8= inmersión en agua a 50°C durante 3 horas + cultivo de meristemos

De los resultados obtenidos sin cultivo de meristemos, el tratamiento 4 es el único efectivo para recuperar plantas no infectadas, si bien el porcentaje de éxito es bajo, un 16,50 %. A pesar de ello es de gran interés considerar este resultado ya que la obtención de meristemos requiere mano de obra más especializada para su realización exitosa y una infraestructura que no se requiere con este tratamiento. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo difieren de los que obtuvieron Guevara y Ovalle (2005), quienes no encontraron diferencias entre el cultivo de meristemos y los tratamientos térmicos, pero sí de estos con el control, obteniendo en promedio 97,2 % de plantas sanas. Esta diferencia puede deberse a errores de detección en la metodología DBIA, que utilizan estos autores y que les está proporcionando falsos negativos. La metodología de PCR como método de diagnóstico utilizada en este trabajo pensamos que es más precisa para llevar a cabo este tipo de análisis.

4.4.7 Saneamiento de plantas infectadas con SCYLV

En cuanto al saneamiento de SCYLV, se han obtenido plantas libres de SCYLV en todos los tratamientos efectuados con este fin (Figura 25). Aunque en la figura

se muestra una variabilidad en los porcentajes de saneamiento, con excepción del control, podemos decir que todos son prácticamente igual de efectivos para eliminar el virus ya que como se vio anteriormente, los tratamientos térmicos influyen disminuyendo el porcentaje de brotación por lo que prácticamente todas las plantas que han brotado han resultado saneadas. Estos resultados difieren con los reportados por Chatenet *et al.* (2001), quienes encontraron que el tratamiento de 50°C durante dos horas no fue efectivo, mientras que obtuvieron 92 % de plantas sanas a partir de cultivo de meristemos. Por otra parte, nuestros resultados son similares a los reportados por Ramgareeb *et al.* (2010) quienes obtuvieron 100 % de plantas sanas a partir de un tratamiento combinado de termoterapia y cultivo de meristemos apicales.

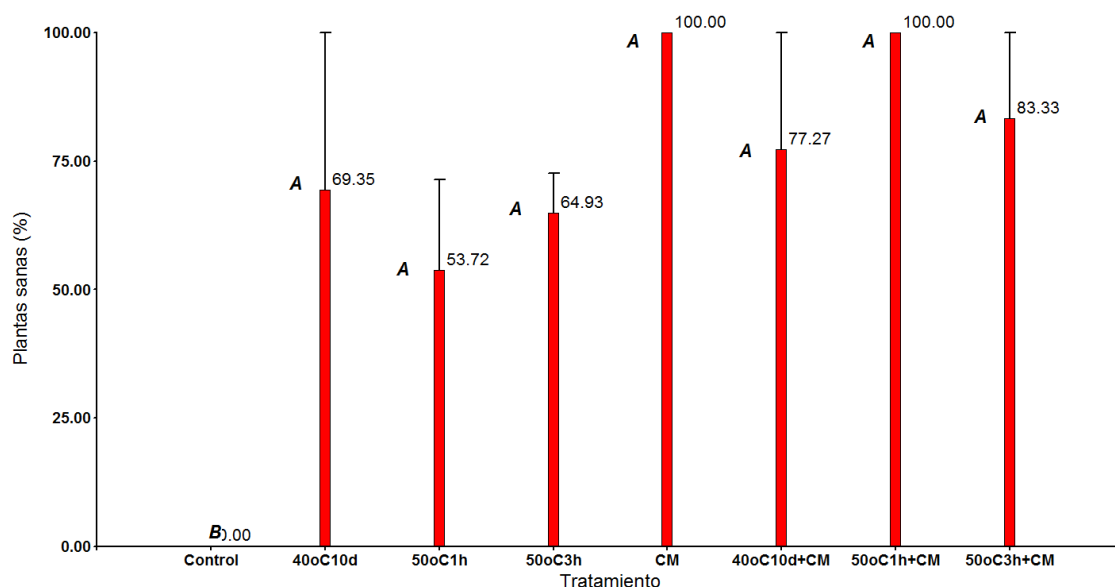


Figura 25. Porcentaje de plantas libres de virus de la hoja amarilla luego de la aplicación de los tratamientos térmicos con y sin cultivo de meristemos. T1= control, T2= horno a 40°C durante 10 días, T3= inmersión en agua a 50°C durante 1 hora, T4= inmersión en agua a 50°C durante 3 horas, T5= cultivo de meristemos, T6= horno a 40°C durante 10 días + cultivo de meristemos, T7= inmersión en agua a 50°C durante 1 hora + cultivo de meristemos, T8= inmersión en agua a 50°C durante 3 horas + cultivo de meristemos

La facilidad de los tratamientos que no requieren el cultivo de meristemos y los porcentajes obtenidos indican que para obtener plantas libres de este virus, la aplicación de los tratamientos de termoterapia es suficiente y conveniente.

4.5 Desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* para la conservación y propagación de material saneado. Evaluación de distintos factores para la inducción de la regeneración a partir de explantes de hoja en genotipos de interés

La propagación de plantas de reproducción vegetativa a partir de material seleccionado y confirmado como libre de patógenos es fundamental para evitar la propagación de la enfermedad desde el inicio. La obtención de materiales saneados en el contexto de este trabajo, nos condujo a plantear su conservación y micropropagación utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. La micropropagación de plantas ofrece una tecnología que permite la multiplicación a gran escala, la conservación *in vitro* por otra parte facilita el intercambio de materiales y es un reservorio de germoplasma que puede introducirse en campo cuando se requiera. Disponer de protocolos de regeneración de plantas a partir de explantes *in vitro* es una vía de multiplicación de germoplasma a gran escala bien por la vía organogénica o la embriogénica (Gisbert, 2011; Gisbert y Picó, 2015) a la vez que es requisito para poder aplicar mejora biotecnológica utilizando la transformación genética. También, este tipo de regeneración puede utilizarse para la obtención de clones de manera masiva o en programas de selección de mutantes o variantes somaclonales (Lackshmanan, 2005). Para la multiplicación de materiales, no pasar por una fase de callo es de interés puesto que esto puede generar la aparición de variantes somaclonales (Snyman *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2008). Si bien, para otros procesos la aparición de callo puede ser de interés para conseguir regeneración *de novo*. En este contexto se han estudiado distintos factores que nos permitan establecer metodologías de regeneración adventicia que puedan servir para iniciar una línea de mejora biotecnológica utilizando la transformación genética en CENGICAÑA.

4.5.1 Conservación y propagación de material saneado

Las plantas saneadas y comprobadas como libres de virus se mantienen *in vitro* en medio de cultivo 1/2MS semisólido con 0,3 mg/l de BAP y una temperatura de 18°C (Figura 26). En este medio de cultivo se pueden mantener los genotipos sin necesidad de subcultivo durante 90 días. Puesto que la utilización de estas condiciones descritas en Snyman *et al.* (2011) han resultado adecuadas para mantener el material realizando pocos subcultivos, se utilizará para la conservación de germoplasma. Una reducción del azúcar y la eliminación de

reguladores de crecimiento en el medio de cultivo se probarán para ralentizar el crecimiento cuando aumente el número de clones a conservar.



Figura 26. Variedades guatemaltecas de caña de azúcar en medio de cultivo para conservación de germoplasma

4.5.2 Inducción de la regeneración a partir de explantes de hojas

La utilización del regulador de crecimiento 2,4-D en combinación con KIN o ANA ha sido utilizada para inducir la regeneración adventicia en explantes de hoja de caña de azúcar (Ramanand y Lal, 2004; Behera y Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2009) En estos trabajos, al igual que ocurre en otros cultivos, el genotipo ha resultado ser un factor determinante en la regeneración, y por ello la necesidad del ajuste de condiciones adecuadas para cada material. En este trabajo se ha tomado como referencia el de Franklin *et al.* (2006) que publicaron que la inducción con 2,4-D (3,0 mg/l) durante 8 días en oscuridad y la posterior transferencia a luz con BAP (0,1 mg/l) + ANA (0,1 mg/l) lograba la regeneración directa que es adecuada cuando queremos llevar a cabo la micropropagación. En primer lugar se comprobó la posible influencia de la posición del explante en la regeneración que ha sido reportada por Lakshmanan *et al.* (2007), así como la influencia de las auxinas AIB o ANA en el enraizamiento y posterior transferencia de las plantas regeneradas. Tomando como base este medio se ha evaluado distintas combinaciones de los reguladores de crecimiento (BAP, KIN y ANA) para determinar cuál es la concentración y/o combinación más adecuada en nuestros genotipos. Por otra parte, se realizó un estudio para determinar la influencia de

la concentración de 2,4-D en la formación de callo y la regeneración de distintas variedades. Como se ha comentado anteriormente la formación de callo también puede ser de interés en otras aplicaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* como la obtención de variantes.

4.5.3 Influencia del tipo de explante (parte basal o distal de la hoja) y del genotipo en la regeneración

En este estudio se evaluaron 12 variedades de CENGICAÑA, algunas de reciente liberación y otras en fases experimentales avanzadas. En la regeneración de plantas a partir de explantes foliares, Shiromani *et al.* (2011) utilizaron secciones hasta 4 cm por arriba del meristemo apical con buenos resultados, sin embargo, Taparia *et al.* (2012) utilizaron secciones hasta 10 cm por arriba. En nuestro estudio utilizamos secciones de hasta 10 cm y los dividimos en dos secciones de 5 cm cada una para evaluar el efecto de la posición del explante respecto a su distancia del meristemo apical (Figura 27).

La posición del explante (parte basal o distal) si influye en el porcentaje de regeneración (Cuadro 17): los explantes basales han mostrado una mayor respuesta tanto para el porcentaje de explantes con regeneración (78,7 % vs. 70,6 %) como en el número de plantas regeneradas por explante (6,8 vs. 4,3) y en la eficiencia de regeneración de plantas (5,6 vs. 3,3). Este último parámetro es de interés pues incluye a los dos anteriores (producto). Los resultados obtenidos confirman los reportados por Lakshmanan *et al.* (2007) quienes encontraron que en el cilindro foliar existe un gradiente de regeneración que disminuye gradualmente del extremo basal al distal, tanto en la producción de brotes adventicios, como en la embriogénesis somática.

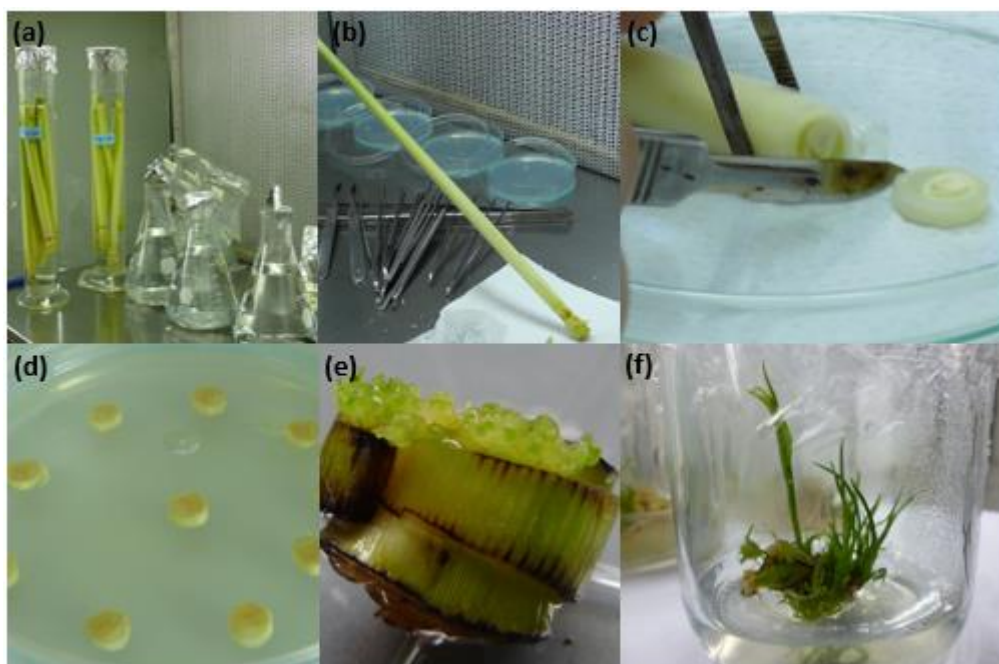


Figura 27. Regeneración de plantas a partir de explantes de hojas (a) desinfección de ápices con hipoclorito de sodio (b) cilindro foliar arriba de la primera yema (c) obtención de discos foliares (d) discos foliares en medio de inducción con 3 mg/l de 2,4-D (e) formación de yemas adventicias y/o embriones somáticos (f) plantas regeneradas a partir de explantes de hojas.

La capacidad de regeneración como era esperable difirió entre genotipos variando entre 56,7-86,7 % a los 45 días de cultivo (Cuadro 18). Es destacable que todos los genotipos estudiados han regenerado en este medio de cultivo con frecuencias superiores al 50 %, lo que implica que es un medio de partida adecuado para nuestros objetivos. En el trabajo de Lakshmanan *et al.* (2006) por ejemplo, de 12 variedades australianas evaluadas, solo regeneraron 5 y con bajas frecuencias entre 2,8 % y 28,9 % cuando sembraron los discos de hoja en medio de regeneración MS con 1 mg/l de BAP y 2 mg/l de ANA.

Contrario a la reportado por Franklin *et al.* (2007) quienes no encontraron diferencia en las respuestas a la regeneración de plantas en 6 variedades desarrolladas en India, las 12 variedades analizadas en nuestro trabajo sí mostraron diferencias en su respuesta al porcentaje de regeneración, tanto a los 35 como a los 45 dds y en el resto de parámetros evaluados (número de plantas

por explante y eficiencia). Este resultado es esperable al haber ensayado un mayor número de variedades y ser la regeneración un carácter altamente dependiente del genotipo.

Cuadro 18. Porcentaje de regeneración de plantas, número de plantas por explante y eficiencia de regeneración para cada factor, variedad y posición del explante.

Factor	Regeneración (%)		Plantas por explante	Eficiencia de regeneración (%) ^b
	35 dds ^a	45 dds		
Variedad				
CG98-10	66.17 a	86.67 a	13.52 a	11.88 a
CG03-025	44.40 a	83.33 a	4.40 c	3.69 d
CG03-98	48.08 a	82.22 a	4.13 c	3.57 d
CG03-240	50.93 a	82.22 a	5.52 b	4.56 c
CG98-78	53.72 a	82.16 a	7.76 b	6.40 c
CG02-163	58.58 a	78.89 a	11.97 a	9.51 b
CG01-53	53.11 a	76.66 a	4.62 c	3.64 d
CG98-46	28.61 c	73.33 a	3.44 c	2.65 d
CG03-104	39.55 b	65.55 b	4.10 c	2.93 d
CG00-102	30.19 c	64.72 b	3.02 c	2.10 d
CG03-256	37.17 b	63.33 c	2.92 c	1.99 d
CG00-033	31.49 c	56.67 d	1.46 d	0.87 e
Posición				
Basal	48.14 a	78.69 a	6.82 a	5.63 a
Distal	42.20 a	70.60 b	4.32 b	3.34 b
ANDEVA ^c				
Variedad	*	***	***	***
Posición	ns	**	***	***
Var x Pos	ns	ns	ns	Ns

^adds=días después de la siembra. ^bEs el producto de la multiplicación regeneración x plantas por explante. Valores promedio dentro de cada columna separados por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.

^c***, * y ns indican significancia a $p < 0.001$, $p < 0.05$ y no significativo, respectivamente

En varios trabajos se ha demostrado el carácter cuantitativo de la capacidad de regeneración. Por ejemplo en tomate se han descrito hasta 6 QTLs implicados en la regeneración (Trujillo-Moya *et al.* 2011) por lo que es esperable que aquellas variedades más similares genéticamente muestren en un mismo medio respuestas similares. En nuestro trabajo se ha podido mostrar por ejemplo similar respuesta en las variedades CG03-104, CG03-240 y CG03-256 de similar constitución genética (hermanos completos).

Las variedades en las que se obtuvo un mayor número de plantas por explante fueron CG98-10 y CG02-163 con 11,9 y 13,5 respectivamente, mientras que la menor respuesta se obtuvo en la variedad CG00-033 con 1,5 plantas. Los rangos obtenidos en el trabajo de García *et al.* (2007), en un grupo de variedades brasileñas varió entre 6,4 y 20,8 plantas por explante. En cuanto a la eficiencia de regeneración la variedad CG98-10 mostró una mayor eficiencia (11,88) respecto al resto de variedades. En el otro extremo encontramos la variedad CG00-033, con 0,87.

4.5.4 Evaluación de distintas combinaciones de reguladores del crecimiento en la multiplicación de plantas

Se inicia este estudio con dos genotipos de interés y confirmados como libres de patógenos: CG98-10 y CG02-163, que son dos variedades comerciales de reciente liberación que en el ensayo anterior mostraron buenas eficiencias de regeneración.

Los resultados obtenidos al analizar los 19 tratamientos y las dos variedades, con relación al número de plantas propagadas en el proceso de cultivo *in vitro* y su altura promedio, se presentan en el Cuadro 19. Los tratamientos con mayor respuesta produjeron entre 9,39 y 12,25 plantas en 45 días, a partir de una planta inicial, mientras que el control absoluto (brotación en medio sin reguladores de crecimiento) solamente produjo 3,82 plantas.

En cuanto a la altura que muestran las plantas a los 45 días de cultivo también difiere entre tratamientos, aunque en todos ellos se consigue un tamaño igual o superior al que se obtiene en medio control y es suficiente para transferir las plantas a enraizar. En este parámetro también se ve la influencia negativa de un exceso de reguladores. En promedio, las plantas micropropagadas de la variedad CG02-163 muestran mayor altura (2,47 cm) que las de la variedad CG98-10 (con 1,84 cm).

4. Resultados y discusión

Cuadro 19. Efecto de los 19 tratamientos evaluados y las dos variedades sobre el número y altura de plantas obtenidas en el proceso de multiplicación *in vitro*.

Factor				NP ^a	AP
Genotipo					
CG02-163				10,51 a	2,47 a
CG98-10				8,70 b	1,84 b
Tratamiento	BAP	KIN	ANA		
1	0	0	0	3,82 f	1,87 d
2	0,3	0	0	11,67 a	2,24 a
3	0,3	0,1	0,01	12,17 a	2,52 a
4	0,3	1	0	11,03 a	2,33 a
5	0,3	0	0,01	8,28 d	2,25 a
6	0,3	0,1	0	8,78 c	2,32 a
7	0,3	1	0,01	12,25 a	2,32 a
8	0,9	0	0	11,06 a	2,15 a
9	0,9	0,1	0,01	10,72 a	2,25 a
10	0,9	1	0	9,28 b	2,00 b
11	0,9	0	0,01	10,61 a	2,02 b
12	0,9	0,1	0	8,44 d	1,91 c
13	0,9	1	0,01	10,83 a	2,36 a
14	2,7	0	0	8,78 c	2,14 a
15	2,7	0,1	0,01	9,39 a	2,23 a
16	2,7	1	0	7,50 e	1,83 e
17	2,7	0	0,01	9,00 c	2,06 b
18	2,7	0,1	0	9,89 a	2,09 b
19	2,7	1	0,01	9,06 c	2,00 b
ANDEVA ^b					
Tratamiento				***	**
Variedad				***	***
Tratamiento x Variedad				ns	Ns

^aNP= número de plantas por explante, AP= altura de planta, para cada factor, tratamiento, genotipo y tratamiento x genotipo. Valores promedio dentro de cada columna separados por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.

^b***, ** y ns indican significancia a $p < 0.001$, $p < 0.01$ y no significativo, respectivamente

El efecto del genotipo en la capacidad de regeneración se ha podido observar a pesar de utilizar dos variables. La variedad CG02-163 mostró tener mayor capacidad de propagación (10,51 plantas en promedio) en comparación con CG98-10 (8,70 plantas). Kaur *et al.* (2008) también encontraron efecto del genotipo en la propagación de brotes en las variedades CoJ83, CoJ85 y Co89003.

En comparación con este trabajo, nuestras variedades han mostrado una mayor tasa de multiplicación para un mismo período de tiempo. La respuesta obtenida con ambas variedades es alta pero no es mejor que la obtenida en el ensayo anterior en la que se utilizó la menor concentración de BAP de las ensayadas en este trabajo. El aumento de la concentración de BAP en vez de promover la formación de un mayor número de tallos, no ha modificado la respuesta (concentración de 0.9) o ha provocado el efecto contrario en la concentración de 2,7 (Cuadro 20). Tampoco la adición de KIN o ANA en las concentraciones estudiadas ha mejorado la respuesta regenerativa en estas variedades.

Cuadro 20. Efecto de los reguladores de crecimiento evaluados sobre el número y altura de plantas obtenidas en el proceso de multiplicación *in vitro* y su altura promedio.

Factor	NP ^a	AP
BAP		
0,3	10,70 a	2,33 a
0,9	10,16 a	2,11 b
2,7	8,94 b	2,06 b
KIN		
0	9,90 a	2,22 a
0,1	9,90 a	2,14 a
1,0	9,99 a	2,14 a
ANA		
0	10,26 a	2,22 a
0,01	9,60 a	2,11 a
ANDEVA ^b		
BAP	**	***
KIN	ns	Ns
ANA	ns	Ns
BAPxKIN	ns	Ns
BAPxANA	ns	Ns
KINxANA	*	Ns
BAPxKINxANA	ns	Ns

^aNP= número de plantas por explante, AP= altura de planta, para cada factor y sus interacciones. Valores promedio dentro de cada columna separados por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.

^b***, **, * y ns indican significancia a $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$ y no significativo, respectivamente

Enraizamiento de plantas in vitro y su supervivencia al trasplante

Con las plantas obtenidas en el tratamiento 0,3 mg/l de BAP se estudió en ambas variedades (CG98-10 y CG02-163) la influencia de las auxinas AIB y ANA a las concentraciones de 2, 4 y 6 mg/l en las variedades. El número medio de raíces

4. Resultados y discusión

que formaron las plantas cultivadas *in vitro* en estos medios, así como su longitud media se presentan en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Número de raíces, longitud de raíces y sobrevivencia al trasplante por variedad, concentración, regulador y tratamiento

Factor				NR ^a	LR	ST
Variedad						
CG98-10				7.57 a	0.90 a	31.64 a
CG02-163				7.10 a	0.51 b	5.86 b
Concentración (mg/l)						
6				11.56 a	0.38 c	27.34 a
4				9.55 b	0.47 b	24.22 a
2				6.40 c	0.54 b	16.41 b
0				1.83 d	1.43 a	7.03 c
Regulador						
AIB				7.93 a	0.97 a	33.2 a
ANA				6.74 b	0.44 b	4.3 b
		Concentración (mg/l)				
Tratamiento	Variedad	Concentración (mg/l)	Regulador			
1	CG02-163	0	AIB	1.55 f	0.84 b	0.00 e
2	CG02-163	2	AIB	6.20 d	0.76 c	9.38 d
3	CG02-163	4	AIB	10.5 b	0.47 d	15.63 d
4	CG02-163	6	AIB	13.3 a	0.37 e	12.5 d
5	CG02-163	0	ANA	0.80 g	0.74 c	9.38 d
6	CG02-163	2	ANA	5.15 e	0.31 e	0.00 e
7	CG02-163	4	ANA	8.85 c	0.33 e	0.00 e
8	CG02-163	6	ANA	10.45 b	0.30 e	0.00 e
9	CG98-10	0	AIB	2.90 f	3.04 a	18.75 d
10	CG98-10	2	AIB	7.35 c	0.79 b	46.88 c
11	CG98-10	4	AIB	10.40 b	0.79 b	71.88 b
12	CG98-10	6	AIB	11.25 b	0.69 c	90.63 a
13	CG98-10	0	ANA	2.05 f	1.10 b	0.00 e
14	CG98-10	2	ANA	6.90 d	0.32 e	9.38 d
15	CG98-10	4	ANA	8.45 c	0.28 e	9.38 d
16	CG98-10	6	ANA	11.25 b	0.18 e	6.25 d
ANDEVA ^b						
Variedad				ns	***	***
Concentración (mg/l)				***	***	***
Regulador				***	***	***
Tratamiento				ns	***	***

^aNR= número de raíces, LR= longitud de raíces, ST= sobrevivencia al trasplante, para cada factor, variedad, concentración, regulador y tratamiento. Valores promedio dentro de cada columna separados por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.

^b***, y ns indican significancia a $p < 0.001$, y no significativo, respectivamente

El número medio de raíces fue superior en los medios con auxina, siendo la variedad CG02-163 en el medio AIB en una concentración de 6 mg/l la que presentó el mayor número de raíces, 13,3 (Figura 28). El ácido indolbutírico con 7,93 en promedio, fue más eficiente en la inducción de raíces que el ácido naftalenacético que produjo 6,74 y la concentración de 6 mg/l de las auxinas fue la que mostró mayor número de raíces, con 11,56. En cambio, la longitud de raíces fue superior en los medios sin auxina o con bajos niveles de auxina. A diferencia de la variable número de raíces, el genotipo si afectó significativamente la longitud de raíces, siendo la variedad CG98-10 la que mostró la mayor longitud radicular, con 0,90 cm, en comparación con la variedad CG02-163 cuyas raíces tuvieron una longitud promedio de 0,51 cm. El tipo de auxina utilizado también influyó significativamente en la longitud de raíces, siendo el AIB la auxina que mostró mayor longitud radicular con 0,97 cm en promedio, mientras que el ANA presentó 0,44 cm. Al contrario del número de raíces, la mayor longitud promedio, 1,43 cm, se obtuvo cuando no se agregaron auxinas al medio. La mayor supervivencia de plantas en el trasplante se obtuvo en la variedad CG98-10 cuyas raíces se formaron en medio con 6 mg/l de AIB. Con relación a los genotipos, la supervivencia fue mejor en la variedad CG98-10 con 31,64 %, mientras que solo 5,68 % en CG02-163. Estos porcentajes de supervivencia son bajos y probablemente se deba a que en esta ocasión se trasplantaron individualmente las plantas, mientras que en años anteriores se trasplantaba un conglomerado. Las mayores concentraciones de auxinas (6 y 4 mg/l) resultaron en mayor supervivencia al trasplante, con 27,34 % y 24,22 %, mientras que de los dos reguladores, el AIB tuvo mayor supervivencia con 33,2 % en comparación con 4,30 % del ANA. Estos resultados nos indican que la mayor supervivencia no ocurre con la mayor longitud de raíces sino con mayor número de ellas y que esta respuesta también depende del genotipo. Similar tendencia obtuvieron en sus resultados Rashid et al. (2009) en el enraizamiento de plantas *in vitro* de la variedad HSF-240 con AIB.



Figura 28. Respuesta al enraizamiento en la variedad CG02-163 con ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) en tres concentraciones y el control.

4.5.5 Efecto de la concentración de 2,4-D

En este estudio como el de la sección anterior, se utilizaron las variedades CG98-10 y CG02-163 por ser los genotipos que mostraron mayor respuesta en la regeneración de plantas a partir de segmentos de hoja. La regeneración de plantas se obtuvo en un medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, luego de la inducción de los explantes con diferentes concentraciones de 2,4-D. Según Lakshmanan (2006), Ho y Vasil reportaron en 1983 que una concentración tan baja como 0,5 mg/l de 2,4-D es suficiente para una máxima inducción de callo embriogénico, sin embargo, es más frecuente la utilización de 3 mg/l (García *et al.*, 2007; Taparia *et al.*, 2012). En nuestro estudio evaluamos un rango entre 1 y 4 mg/l de 2,4-D, encontrando que los mayores porcentajes de regeneración se obtuvieron en la variedad CG02-163 en medios de cultivo con concentraciones de 2,4-D de 2, 3 y 4 mg/l y la variedad CG98-10 en el medio con 3 mg de 2,4-D/l (Cuadro 22). Se muestra también que las concentraciones de 2, 3 y 4 mg de 2,4-

D/I tienen los porcentajes más altos de regeneración y que sin la inducción de esta auxina no se produce regeneración de plantas como lo muestra el resultado del control sin 2,4-D. Se pudo observar, como se muestra en la Figura 29, que las concentraciones de 1 y 2 mg/l regeneraron plantas de forma directa, mientras que las concentraciones de 3 y 4 mg/l regeneraron plantas tanto por la vía directa como indirecta. Estos resultados confirman que un pretratamiento con 2,4-D a una concentración de 3 mg/l durante más de 8 días da origen a la formación de callo, como reportaron Franklin et al. (2007). El genotipo también influyó sobre el porcentaje de explantes con regeneración, siendo la variedad CG02-163 la que mostró la mayor respuesta.

El Cuadro 22 también muestra que, en cuanto al número de plantas regeneradas por explante, los tratamientos mostraron una influencia significativa. La variedad CG98-10 combinada con 1, 2 y 3 mg de 2,4-D/l tuvo una mayor respuesta, mientras que la variedad CG02-163 tuvo la menor respuesta, sin importar la concentración del regulador. Por el contrario, la concentración de 2,4-D no mostró efecto sobre el número de plantas regeneradas por explante. Shiromani *et al.* (2011) tampoco encontraron diferencias en la regeneración de plantas al evaluar concentraciones de 2,4-D entre 1 y 3 mg/l en la variedad Q208. La variedad mostró un efecto significativo sobre el número de plantas regeneradas por explante, siendo la variedad CG98-10 la que mostró una mayor respuesta, con 21,3 plantas, en comparación con la variedad CG02-163 que regeneró en promedio 4,4 plantas por explante.

4. Resultados y discusión

Cuadro 22. Porcentaje de regeneración de plantas, plantas por explante y eficiencia de la regeneración por variedad, en un medio sin reguladores de crecimiento, luego de la inducción con diferentes concentraciones de 2,4-D en dos variedades

Factor		Regeneración (%)	Plantas por explante	Eficiencia ^a
Variedad				
CG98-10		45.34 b	21.32 a	12.38 a
CG02-163		56.00 a	4.41 b	3.33 b
Concentración				
0		0.00 c	0.00 b	0.00 c
1		52.36 b	14.82 a	8.17 b
2		65.66 a	16.20 a	9.99 a
3		72.96 a	18.75 a	13.00 a
4		62.37 a	14.54 a	8.13 b
Variedad x concentración				
Variedad	Concentración			
CG02-163	0	0.00 e	0.00 d	0.00 e
CG02-163	1	52.00 c	2.40 c	1.37 d
CG02-163	2	71.33 a	6.28 c	4.77 c
CG02-163	3	78.67 a	5.08 c	4.02 c
CG02-163	4	78.00 a	8.29 c	6.50 c
CG98-10	0	0.00 e	0.00 d	0.00 e
CG98-10	1	52.72 c	27.24 a	14.96 b
CG98-10	2	59.98 b	26.12 a	15.20 b
CG98-10	3	67.26 a	32.42 a	21.97 a
CG98-10	4	46.74 d	20.84 b	9.77 b
ANDEVA ^b				
Variedad		**	***	***
Concentración		***	***	***
Variedad x concentración		*	***	***

Valores promedio dentro de cada columna separados por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.

^aEs el producto de la multiplicación regeneración x plantas por explante.

^b***, ** y * indican significancia a $p < 0.001$, $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente

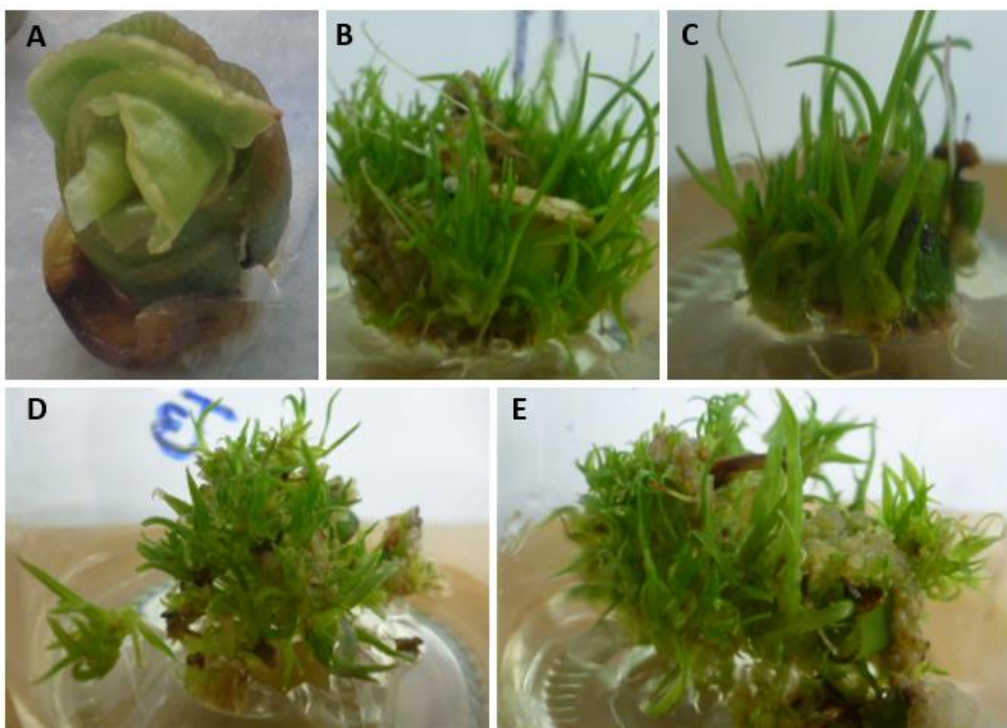


Figura 29. Regeneración de plantas en discos foliares cultivados con diferentes concentraciones de 2,4-D. (A) Control (B) 1 mg/l (C) 2 mg/l (D) 3 mg/l y (E) 4 mg/l.

La eficiencia de regeneración varió entre los tratamientos evaluados. Puede observarse que la variedad CG98-10 combinada con 3 mg de 2,4-D/l presentó la mayor eficiencia de regeneración de plantas (21,9). Las menores eficiencias fueron para la variedad CG02-163 en combinación con cualquier concentración de 2,4-D. En el Cuadro 21 se muestra además, el efecto que tuvo la concentración de 2,4-D sobre la eficiencia de regeneración de plantas, siendo las concentraciones más eficientes, 2 y 3 mg/l. Las mejores concentraciones en nuestro estudio concuerdan con las reportadas por Franklin *et al.* (2007), García *et al.* (2007) y Snyman *et al.* (2011). La eficiencia de regeneración de plantas también se vio influida por el genotipo, siendo la variedad CG98-10 la más eficiente, con 12,3 plantas regeneradas por explante sembrado, en comparación con CG02-163 que regeneró 3,3.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha aplicado y desarrollado distintas tecnologías con el fin de introducir la biotecnología en los programas de mejora de caña de azúcar que se llevan a cabo en Guatemala. Las conclusiones que se desprenden de las actuaciones realizadas son las siguientes:

1. Los marcadores tipo microsatélite CV29, CV37 y CV38 resultaron útiles para iniciar la evaluación de la diversidad genética de 204 variedades de caña de azúcar de la colección de germoplasma de CENGICAÑA. Se obtuvo un coeficiente de diversidad promedio de 0,37. El rango de variación en la población fue de 0,50-0,90. Este resultado es de interés pues indica la existencia de variabilidad que se suponía escasa teniendo en cuenta que el 73,04 % de las variedades tienen la misma procedencia (Canal Point, Estados Unidos). Tomando 0,63 como coeficiente máximo de similitud se separaron 20 grupos que se utilizaron como referencia en la planificación de cruza.
2. La utilización del marcador molecular R12H16 determinó la presencia del alelo *Bru1* de resistencia a Roya Marrón en 77 de las 304 variedades analizadas (25 %). El fenotipado llevado a cabo en 4 anualidades y dos localidades distintas, indicó que la presencia de este alelo se correlaciona con resistencia a la enfermedad pero que la ausencia de éste no es indicativa de susceptibilidad. El resultado obtenido indica una alta probabilidad de la presencia en este germoplasma de otra u otras fuentes de resistencia. Disponer en la colección de distintas fuentes de resistencia es de gran interés pues su utilización minimiza el riesgo de aparición de patógenos que superen la resistencia.
3. De las 22 cruza realizadas durante dos anualidades teniendo en cuenta la información obtenida en los objetivos anteriores se seleccionaron:
 - En la primera anualidad, familias que mostraron entre un 2,3-2,5 % más Brix que el control. En la segunda tanda de cruzamientos, descendencias

con valores promedio de 24,8 y 23,3 de Brix siendo elevados también la altura y nº de tallos obtenidos en el primero y, el diámetro de la caña en el segundo.

- De todas las progenies ensayadas cabe destacar las de dos cruces de la segunda anualidad que mostraron un bajo porcentaje de plantas infectadas con los distintos patógenos, incluyendo la roya naranja que ha afectado hasta el 100% de las plantas control en una de las anualidades. Las plantas F_1 del cruzamiento nº 5 de la primera tanda y el nº 6 de la segunda, ambos con buen rendimiento en Brix, mostraron alta tolerancia al mosaico y a la roya naranja, respectivamente. Los dos parentales del cruce nº 8 también seleccionado por Brix, son portadores del alelo *Bru1*. Por lo tanto, todas estas poblaciones F_1 han sido seleccionadas para continuar con el programa de mejora.

4. La propagación vegetativa de materiales seleccionados con patógenos en estado latente es una de las principales vías de propagación de enfermedades. En este contexto:

- Se ha confirmado la presencia de materiales infectados con *Xanthomonas albilineans* utilizando la técnica DBIA y la técnica PCR siendo más eficiente la segunda. La amplificación de cDNA a partir de ARN vírico permitió confirmar la presencia del virus de la hoja amarilla en 84,70 % de las muestras. Las muestras con síntomas que no amplificaron el virus podrían estar infectadas por el fitoplasma del amarillamiento.
- La prospección realizada al azar en distintas zonas de cultivo ha indicado una baja incidencia de *X. albilineans* (7 %) y una alta incidencia (33 %) del virus del amarillamiento que ha sido mayor en zonas más frías.
- En la secuenciación de un fragmento del gen de la albicidina de *X. albilineans* se ha identificado 2 SNPs. Esto podría indicar de manera preliminar la presencia en Guatemala de al menos dos cepas de la bacteria.

- Entre los distintos tratamientos de termoterapia en combinación o no con el cultivo de meristemos utilizados para obtener materiales saneados se ha determinado que el más eficiente para materiales infectados con *Xanthomonas albilineans* es el cultivo de meristemos mientras que la termoterapia es suficiente para obtener materiales libres del virus de la hoja amarilla.
5. Puede afirmarse que contamos con una metodología para la conservación y propagación *in vitro* de germoplasma de caña de azúcar así como de protocolos que permiten la inducción de la regeneración adventicia a partir de explantes de hoja. En los ensayos realizados se ha podido determinar:
- La adecuación del medio de cultivo utilizado para la conservación *in vitro* del germoplasma saneado.
 - La influencia del genotipo y el tipo de explante en la capacidad de regeneración.
 - La adecuación del regulador de crecimiento BAP en concentraciones de 0,3 mg/l para la multiplicación de material.
 - Una respuesta diferencial según el tipo de explante, siendo más eficiente para la regeneración adventicia el disco de hoja basal.
 - Una mejor respuesta de las plantas para enraizar cuando se utiliza el ácido indolbutírico (6 mg/l).
 - La posibilidad de obtener regeneración directa o indirecta al utilizar en el medio de inducción distintas concentraciones del regulador de crecimiento 2,4-D.

Los protocolos de regeneración adventicia desarrollados pueden utilizarse para aumentar la tasa de multiplicación y son la base para poder aplicar otras técnicas biotecnológicas como la transformación genética.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abu Ahmad Y., Girard J.-C., Fernandez E., Pauquet J., Lockhart B., Letourmy P., Rott P. (2006). Variation in virus populations and growth characteristics of two sugarcane cultivars naturally infected by sugarcane yellow leaf virus in different geographical locations. *Plant Pathology* 56: 743-754.

Acosta C., López J., Angel, J.C., Victoria J. (2012). Presencia del gen Bru 1 asociado con resistencia a roya café (*Puccinia melanocephala*) en el Banco de Germoplasma de CENICAÑA. Memoria Congreso ATALAC, Tecnicaña, Colombia.

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

Aitken K., McNeil M. (2010) Diversity analysis. In: Genetics, genomics and breeding of sugarcane. Henry, R. y Kole C. (eds.). CRC Press, New York. 264p.

Aitken, K., Jackson, P., McIntyre, C. (2005). A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous groups in a sugarcane cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* , 110:789-801.

Al-Janabi S., Honeycutt R., McClelland M., Sobral B. (1993). A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics* , 134:1249-1260.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:403-410.

Alvarez A.M., Schenck S., y Benedict A.A. (1996). Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. *Plant Pathology* 15, 358-366.

Ángel J.C., Cadavid M., Correa J. (2010). Presencia de la roya naranja (*Puccinia kuehnii*) en el valle del río Cauca, Colombia. Carta trimestral Nos. 3 y 4. Cenicana.

Asnaghi C., Roques D., Ruffel S., Kaye C., Hoarau J.Y., Télismart H., Girard J.C., Raboin L.M., Risterucci A.M., Grivet L., D'Hont A. (2004). Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Bru1*) using bulked segregant analysis and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 759-764.

ASAZGUA. Asociación de Azucareros de Guatemala. (2012). Economía. www.azucar.com.gt. Consultado Diciembre 2014.

Azofeita A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.

Behera K., Sahoo S. (2009). Rapid *in vitro* micro propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. *Nature and Science* 7(4): 1-10.

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.

Carson D., Hockett B., Botha F. (2002). Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. *Plant Science* , 162:289-300.

CENGICAÑA. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. (2011) Boletín estadístico. Año 12, No. 1.

CENGICAÑA. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. (2012). El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala. Melgar M., Meneses A., Orozco H., Pérez O. y Espinosa R. (eds.). Guatemala 512 p.

Champoiseau P., Daugrois J.H., Girard J.C., Royer M., Rott, P.C. (2006). Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity in *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96(1): 33-45.

Chatenet M., Delage C., Ripolles M., Irely M., Lockhart B.E.L., Rott P. (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., Miller J.D. (2003). Incidence and spread of sugarcane yellow leaf virus in sugarcane clones in the CP-cultivar development program at Canal Point. *Journal American Society of Sugarcane Technologists*. 23: 71-78.

Comstock J.C., Irely M.S. (1992). Detection of the Sugarcane Leaf Scald Pathogen *Xanthomonas albilineans*, using Tissue Blot Immunoassay ELISA and isolation techniques. *Plant disease* 76 (10): 1033-1035.

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

Costet L., Le Cunff L., Royaert S., Raboin L.M., Hervouet C., Toubi L., *et al.* (2012). Haplotype structure around *Bru1* reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. DOI 10.1007/s00122-012-1875-x.

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.

Daugrois J.H., Grivet L., Roques D., Hoarau J.Y., Lombard H., Glaszmann J.C., D'Hont A. (1996). A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. *Theoretical and Applied Genetics* 92 (8): 1059-1064.

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.*

Davis M.J., Rott P., Baudin P., Dean J.L. (1994). Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant disease* 78(1):78-82.

Davis M.J., Rott P., Warmuth C.J., Chatenet M., Baudin P. (1997). Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans* the leaf scald sugarcane pathogen. *Molecular Plant Pathology* 87(3): 316-324.

D'Hont A., Ison D., Alix K., Roux C., Glaszmann J.-C. (1998). Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping or ribosomal RNA genes. *Genome Research*, 41:221-225.

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.

ElSayed A., Weig A. (2010). Molecular characterization of Hawaiian Sugarcane yellow leaf virus and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries. *European Journal of Plant Pathology*. 129:399-412.

FAO. (2015). FAOSTAT. Revisado el 03 de agosto de 2015 en http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/S

FAOSTAT. (2010). Statistical Database. <http://faostat.fao.org>. Consultado Enero 2012.

FAOSTAT. (2010). Statistical Database. <http://faostat.fao.org>. Consultado Diciembre 2014.

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., Mansur E. (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.

Girard J.-C., Fernandez E., Daugrois J.-H., Roques D., Roumagnac P., Rott P. (2010). Genetic diversity of yellow leaf virus in a sugarcane selection plot in Guadeloupe (FWI). *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. 27: 1-9.

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.

Gisbert C. (2011). Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. Colección RIUNET. Universitat Politècnica de València

Gisbert C., Picó B. (2015). Micropropagación. Colección RIUNET. Universitat Politècnica de València

Glynn N., Comstock J. and McCorkle K. (2012). Screening for resistance to brown rust of sugarcane: Use of *Bru1* resistance gene prospects and challenges. American Society of Sugarcane Technologists, 32: 82.

Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. Nucleic acids research doi:10.1093/nar/gkq313

Harvey M., Botha F.C. (1996). Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. Euphytica 89:257-265.

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.

Heller-Uszynska K., Uszynski G., Huttner E., Evers M., Carlig J., Caig V., *et al.* (2010). Diversity Arrays Technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane. *Molecular Breeding* doi 10.1007/s11032-010-9460-y.

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.

Hoarau J., Offman B., D'Hont A., Risterucci A., Roques D., Glaszmann J., *et al.* (2001). Genetic dissection of a modern cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 103:84-97.

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.

Hoisington D, Khairallah M, González-de-Léon D: Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory México: CYMMYT; 1994.

Huerta-Lara M., Rojas-Martínez R.I., Bautista-Calles J., Reyes-Lopez D., Becerril-Herrera M., Romero-Arenas O., *et al.* (2009). Genetic and pathogenic diversity of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in Mexico. Research Journal of Biological Sciences 4(3): 312-319.

Kaur A., Gill M.S., Ruma D., Gosal S.S. (2008). Enhanced *in vitro* shoot multiplication and elongation in sugarcane using cefotaxime. Sugar Tech 10 (1): 60-64.

Jackson P. A. (2005). Breeding for improved sugar content in sugarcane. Field Crops Research 92: 277-290.

Jaufeeraly-Fakim Y., Autrey J.C., Daniels M.J., Dookun A. (2000). Genetic polymorphism in *Xanthomonas albilineans* strains originating from 11 geographical locations, revealed by two DNA probes. *Letters in Applied Microbiology* 30: 287-293.

Jenkins B., Baptista P., Porth M. (2015). Collaborating for change in sugar production: Building blocks for sustainability at scale. Harvard Kennedy School. Cambridge 55p.

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.

Joomun N., Dookum-Saumtally A. (2010). Occurrence of three genotypes of sugarcane yellow leaf virus in a variety collection in Mauritius. *Sugar Tech* 12(3): 312-316.

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.

Lackshmanan 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

Lakshamanan P., Geijskes R., Wang L., Elliot A., Grof C., Berding N., Smith G. (2006). Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. Interspecific hybrids) leaf culture.

Le Cunff, L., Garsmeur, O., Raboin, L., Pauquet, J., Telismart, H., Selvi, A., *et al.* (2008). Diploid/Polyploid Syntenic Shuttle Mapping and Haplotype-Specific Chromosome Walking Toward a Rust Resistance Gene (*Bru1*) in Highly Polyploid Sugarcane (2n=12x=115). *Genetics*, 180:649-660.

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.

Maccheroni W., Jordao H., Degaspari R., Matsuoka S. (2007). Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. (26):889-900.

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.

Molina L., Queme J.L., Rosales F. (2013): Comparative analysis between phenotype and *Bru1* marker for incidence to brown rust in sugarcane. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. 28, 738—743.

Moore P.H., Paterson A.H., Tew T. (2014). Sugarcane: The crop, the plant and domestication. En: Sugarcane: Physiology, Biochemistry and Functional Biology. P. Moore and F. Botha (Eds.). Wiley Blackwell 716p.

Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* , 15: 473-497.

OECD. The Organisation for Economic Co-operation and Development. (2013). Consensus document on the biology of sugarcane (*Saccharum* spp.). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 56. ENV/JM/MONO(2013)22. Paris. 91p.

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.). CENGICAÑA, 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.). CENGICAÑA, Guatemala 512 p.

Pan Y.B., Scheffler B.E., Richard, E.P. (2007). High-throughput Molecular Genotyping of Commercial Sugarcane Clones with Microsatellite (SSR) Markers. *Sugar Tech* 9(2y3) (2007) : 176-181.

Pandey A., Mishra R.K., Mishra S., Singh Y.P., Pathak S. (2011). Assessment of Genetic Diversity among Sugarcane Cultivars (*Saccharum officinarum* L.) using Simple Sequence Repeats Markers. *OnLine Journal of Biology Science*. 11 (4): 105-111.

Parida S.K., Kalia S.K., Kaul S., Dalal V., Hemaprabha G., Selvi A., Pandit A., Singh A., Gaikwad K., Sharma T.R., Srivastava P.S., Singh N., Mohapatra T. (2008). Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics* doi: 1007/s00122-008-0902-4.

Parmessur Y., Aljanabi S., Saumtally S., &Dookum-Saumtally A. (2002). Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *PlantPathology* , 51: 561-566.

Perera M., Arias M., Costilla D., Luque C., García M., Díaz Romero C., Racedo J., Ostengo S., Filippone M, Cuenya M, Castagnaro, A. (2012). Genetic diversity assessment and genotype identification in sugarcane based on DNA markers and morphological traits. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-012-0661-9.

Purdy L., Dean L. (1981). A System for record data about sugarcane rus7host interaction. *Sugarcane Pathology Newsletter*. 27:35-40

Que Y.X., Pan Y.B., Lu Y., Yang C., Yang Y., Huang N., Xu L. (2014). Genetic Analysis of Diversity within a Chinese Local Sugarcane Germplasm Based on Start Codon Targeted

Polymorphism. BioMed Research International. Article ID 468375, 10 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/468375>

Quemé J., Molina L., Melgar M. (2005). Analysis of genetic similarity among 48 sugarcane varieties using microsatellite DNA sequences. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. (25): 592-596.

Radice S. (2010). Morfogénesis. En: *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, L. Mroginsky (eds.). INTA 856p. Disponible en: http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf

Ramanand Lal M. (2004). An efficient protocol for *in vitro* micropropagation of sugarcane. *Sugar Tech* 6(1 y 2): 85-87.

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.

Rashid H., Khan S., Zia M., Chaudary M., Hanif Z., Chaudary Z. (2009). Callus induction and regeneration in elite sugarcane cultivar HSF-240. *Pak. J. Bot.* 41 (4): 1645-1649.

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

Rohlf F.J. (2003). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYSpc). Exeter Software, New York.

Rott P., Davis M.J. 1996. Recent advances in research on variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. In: *International Society of Sugarcane Technologists Congress, 22., 1995. Proceedings*. Cali:Tecnicaña, 1996. v.2, p.498-503.

Rott P.C., Costet L., Davis M.J., Frutos R., Gabriel D.W. (1996). At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Bacteriology* 178(15): 4590-4596.

Roughan P., Waldron J., Glasziou K. (1971). Starch inheritance in *Saccharum*. Enzyme polymorphism for B-amylase in interspecific and intergeneric hybrids. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* , 14:257-265.

Sandhu H.S., Rott P., Comstock J.C., Gilbert R.A. (2013). Sugarcane Leaf Scald Disease. In: *Florida Sugarcane Handbook*. Universidad de Florida. Publicación #SS-AGR-201. Consultado el 04 de diciembre de 2014 en: <https://edis.ifas.ufl.edu/sc001>

Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74: 5463-7.

SCOPE (2015). Bioenergy and sustainability: bridging the gaps. Glauca Mendes, Reynaldo Victoria, Carlos Joly, Luciano Verdade (eds.). Sao Paulo 779p.

Schenk S., Crepeau M.W., Wu K.K., Moore P.H., Yu Q., Ming R. (2004). Genetic Diversity and Relationships in Native Hawaiian *Saccharum officinarum* Sugarcane. *Journal of Heredity* 95 (4): 327-331.

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.

Singh R., Mishra S., Singh S., Mishra N., Sharma M. (2010). Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. *Australian Journal of Crop Science*, 116-125.

Singh G., Sandhu S.K., Meeta M., Singh K., Gill R., Gosal S.S. (2008). In vitro induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. *Euphytica* 160: 35-47.

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., 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 Cell Development and Biology of Plant*. DOI 10.1007/s11627-011-9354-7.

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.

Stokes I.E., Tysdal H.M. (1962). Significant trends in genealogies of Canal Point varieties of sugar cane. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, 11: 456-464.

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.

Taparia Y., Gallo M., Altpeter F. (2012). Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. DOI 10.1007/s-11240-012-0177-y.

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.

Todd J., Glaz B., Burner D., Kimbeng C. (2015). Historical Use of Cultivars as Parents in Florida and Louisiana Sugarcane Breeding Programs. *International Scholarly Research Notices*, vol. 2015, Article ID 257417, 9 pages, 2015. doi:10.1155/2015/257417

Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, Nuez F (2011). Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato. *BMC Plant Biology*. 11:140, doi: 10.1186/1471-2229-11-140.

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.

Wu K., Burnquist W., Sorrells M., Tew T., Moore P., Tanksley S. (1992). The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics* , 83:294-300.

You Q., Xu L., Zheng Y., Que Y.X. (2013). Genetic Diversity Analysis of Sugarcane Parents in Chinese Breeding Programmes Using gSSR Markers. *The ScientificWorld Journal*, Article ID 613062, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/613062>.

Zhang L., Xu J., Birch R.G. (1999). Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nature Biotechnology* 17: 1021-1024 doi 10.1038/13721.

7. Anexos

7. Anexos

Anexo 1. Evaluación fenotípica de la enfermedad roya marrón en 304 variedades de caña de azúcar en dos localidades durante los años 2008, 2011, 2013 y 2014. Las casillas de los años 2008 y 2011 reúnen la información de las dos localidades.

No.	Variedad	Camantulul								Los Tarros			
		2008		2011		2012		2013		2012		2013	
		I (%)	R	I (%)	R	I (%)	R	I (%)	R	I (%)	R	I (%)	R
1	B47258	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	B4744					0	0	0	0	0	0	0	0
3	B73375					0	0	0	0	0	0	0	0
4	BA11569					0	0	0	0	0	0	0	0
5	BJ5732					0	0	0	0	0	0	0	0
6	CB40-35					0	0	0	0	0	0	0	0
7	CG00-033					0	0	0	0	0	0	0	0
8	CG02-064			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	CG02-064			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	CG03-025			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	CG05-07344					0	0	0	0	0	0	0	0
12	CG99-099					0	0	0	0	0	0	0	0
13	CGCP95-53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Co421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Co997	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	CP00-1570					0	0	0	0	0	0	0	0
17	CP00-1607					0	0	0	0	0	0	0	0
18	CP00-1610					0	0	0	0	0	0	0	0
19	CP00-1830					0	0	0	0	0	0	0	0
20	CP00-2180					0	0	0	0	0	0	0	0
21	CP00-7753					0	0	0	0	0	0	0	0
22	CP01-1338					0	0	0	0	0	0	0	0
23	CP01-1614					0	0	0	0	0	0	0	0
24	CP01-1779					0	0	0	0	0	0	0	0
25	CP01-1802					0	0	0	0	0	0	0	0
26	CP02-1668					0	0	0	0	0	0	0	0
27	CP02-1756					0	0	0	0	0	0	0	0
28	CP02-1769					0	0	0	0	0	0	0	0
29	CP02-1840					0	0	0	0	0	0	0	0
30	CP02-1915					0	0	0	0	0	0	0	0
31	CP02-2113					0	0	0	0	0	0	0	0
32	CP03-1103					0	0	0	0	0	0	0	0
33	CP03-1646					0	0	0	0	0	0	0	0
34	CP03-1688					0	0	0	0	0	0	1	5
35	CP03-1724					0	0	0	0	0	0	0	0
36	CP04-2115					0	0	0	0	0	0	0	0
37	CP56-59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	CP62-374	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
39	CP66-346					0	0	0	0	0	0	0	0

7. Anexos

40	CP72-2086	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	CP75-1632					0	0	0	0	0	0	0	0
42	CP78-1247					0	0	0	0	0	0	0	0
43	CP88-1508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	CP89-2143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	CP94-1182					0	0	0	0	0	0	0	0
46	CP96-1068					0	0	0	0	0	0	0	0
47	CP96-1120					0	0	0	0	0	0	0	0
48	CP97-1931					0	0	0	0	0	0	0	0
49	CP98-1029					0	0	0	0	0	0	0	0
50	CP99-1944					0	0	0	0	0	0	0	0
51	CPCL00-6131					0	0	0	0	0	0	0	0
52	CPCL02-0878					0	0	0	0	0	0	0	0
53	CPCL02-2584					0	0	0	0	0	0	0	0
54	Ja64-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	Mex57-29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	Mex57-473	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	Mex60-445					0	0	0	0	1	5	0	0
58	Mex69-290	0	0	0	0	0	0	0	0				
59	Mex73-523	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0
60	Mex75-1705					0	0	0	0	0	0	0	0
61	Mex79-431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	Mex82-114									0	0	0	0
63	PGM89-968	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	POJ2714					0	0	0	0	0	0	0	0
65	PR78-3012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	PR83-2046					0	0	0	0	0	0	0	0
67	PR87-2004					0	0	0	0	0	0	0	0
68	PR87-2015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	PR87-3025					0	0	0	0	0	0	0	0
70	PR99-7					0	0	0	0	0	0	0	0
71	R570					0	0	0	0	0	0	0	0
72	RB732577	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	RB845210			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	RD75-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	San Felipe					0	0	0	0	0	0	0	0
76	SP70-4768					0	0	0	0	0	0	0	0
77	SP79-2233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	Akoki					0	0	0	0	0	0	0	0
79	B74-132					0	0	0	0	0	0	0	0
80	C116-67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	C87-51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	CB46-47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	CC82-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	CC85-92					0	0	0	0	0	0	0	0

7. Anexos

85	CG00-032					0	0	0	0	0	0	0	1	5
86	CG00-043					0	0	0	0					
87	CG00-092					0	0	0	0					
88	CG00-102			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	CG00-111					0	0	0	0	0	0	0	1	3
90	CG00-120					0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	CG00-129					0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	CG01-17					0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	CG01-27					0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	CG01-52					0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	CG01-53			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	CG01-53			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	CG01-60					0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	CG01-87					0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	CG02-007					0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	CG02-144					0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	CG02-163					0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	CG03-047			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	CG03-098					0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	CG03-104					0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	CG03-114					0	0	0	0	0	0	0	0	0
106	CG03-138					0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	CG03-240			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	CG03-242					0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	CG03-256			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110	CG95-107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111	CG96-40	0	0	1	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0
112	CG96-78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	CG98-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114	CG98-100					0	0	1	5	0	0	0	0	0
115	CG98-32					0	0	0	0	0	0	0	0	0
116	CG98-46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	CG98-46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118	CG98-62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	CG98-78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	CG99-045					0	0	0	0	0	0	0	0	0
121	CG99-048					0	0	0	0	0	0	0	0	0
122	CG99-087					0	0	0	0	0	0	0	0	0
123	CG99-125					0	0	0	0	0	0	0	0	0
124	CGCP95-50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125	CGSP98-11					0	0	0	0	0	0	0	0	0
126	CGSP98-12					0	0	0	0	0	0	0	0	0
127	CGSP98-16					0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	CL61-620	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
129	Co270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

7. Anexos

130	CP00-1071					0	0	0	0	0	0	0	0
131	CP00-1100					0	0	0	0	0	0	0	0
132	CP00-1101					0	0	0	0	0	0	0	0
133	CP00-1359					0	0	0	0	0	0	0	0
134	CP00-1675					0	0	0	0	0	0	0	0
135	CP00-1683					0	0	0	0	0	0	0	0
136	CP00-1748					0	0	0	0	0	0	0	0
137	CP00-1749					0	0	0	0	0	0	0	0
138	CP00-1751					0	0	0	0	0	0	0	0
139	CP00-1758					0	0	0	0	0	0	0	0
140	CP00-1763					0	0	0	0	0	0	1	5
141	CP00-1803					0	0	0	0	0	0	0	0
142	CP00-1810					0	0	0	0	0	0	0	0
143	CP00-1825					0	0	0	0	0	0	1	5
144	CP00-2164					0	0	0	0	0	0	0	0
145	CP01-1262					0	0	0	0	0	0	0	0
146	CP01-1372					0	0	0	0	0	0	0	0
147	CP01-1449					0	0	0	0	0	0	0	0
148	CP01-1750					0	0	0	0	0	0	0	0
149	CP01-2471					0	0	0	0	0	0	0	0
150	CP01-2634					0	0	0	0	0	0	0	0
151	CP02-1049					0	0	0	0	0	0	0	0
152	CP02-1050					0	0	0	0	0	0	0	0
153	CP02-1120					0	0	0	0	0	0	0	0
154	CP02-1124					0	0	0	0	0	0	0	0
155	CP02-1255					0	0	0	0	0	0	0	0
156	CP02-1334					0	0	0	0	0	0	0	0
157	CP02-1345					0	0	0	0	0	0	0	0
158	CP02-1593					0	0	0	0	0	0	0	0
159	CP02-1703					0	0	0	0	0	0	0	0
160	CP02-1784					0	0	0	0	0	0	6	5
161	CP02-1807					0	0	0	0	0	0	0	0
162	CP02-1966					0	0	0	0	0	0	0	0
163	CP02-1969					0	0	0	0	0	0	1	5
164	CP02-2584					0	0	0	0	0	0	0	0
165	CP03-1002					0	0	0	0	0	0	0	0
166	CP03-1494					0	0	0	0	0	0	0	0
167	CP03-1553					0	0	0	0	0	0	0	0
168	CP03-1585					0	0	0	0	0	0	0	0
169	CP03-1594					0	0	0	0	0	0	0	0
170	CP03-1660					0	0	0	0	0	0	0	0
171	CP03-2212					0	0	0	0	0	0	0	0
172	CP04-1067					0	0	0	0	0	0	0	0
173	CP04-119					0	0	0	0	0	0	0	0
174	CP04-1510					0	0	0	0	0	0	0	0

7. Anexos

175	CP04-2076					0	0	0	0	0	0	0	0
176	CP27-139					0	0	0	0	0	0	0	0
177	CP29-126					0	0	0	0	0	0	0	0
178	CP48-103					0	0	0	0	0	0	0	0
179	CP52-43					0	0	0	0	0	0	0	0
180	CP53-6					0	0	0	0	0	0	0	0
181	CP63-588	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	CP65-357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	CP67-42					0	0	0	0	0	0	0	0
184	CP70-321					0	0	0	0	0	0	1	5
185	CP72-1210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
186	CP72-1312	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
187	CP73-1547	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188	CP75-1082					0	0	0	0	0	0	0	0
189	CP75-1553					0	0	0	0	0	0	0	0
190	CP76-328									0	0	0	0
191	CP77-1055					0	0	0	0	0	0	0	0
192	CP78-1628					0	0	0	0	0	0	0	0
193	CP79-332					0	0	0	0	0	0	0	0
194	CP80-1743					0	0	0	0	0	0	0	0
195	CP80-1752					0	0	0	0	0	0	0	0
196	CP80-1827					0	0	0	0	0	0	0	0
197	CP81-1335					0	0	0	0	0	0	0	0
198	CP81-1383					0	0	0	0	0	0	0	0
199	CP82-2043					0	0	0	0	0	0	0	0
200	CP85-1482					0	0	0	0	0	0	0	0
201	CP86-1209					0	0	0	0	0	0	0	0
202	CP86-1614					0	0	0	0	0	0	0	0
203	CP86-1623					0	0	0	0	0	0	0	0
204	CP86-1633					0	0	0	0	0	0	0	0
205	CP86-1664					0	0	0	0	0	0	0	0
206	CP86-1705					0	0	0	0	0	0	0	0
207	CP86-1747					0	0	0	0	0	0	0	0
208	CP86-2024					0	0	0	0	0	0	0	0
209	CP87-1141					0	0	0	0	0	0	0	0
210	CP87-1500					0	0	0	0	0	0	0	0
211	CP88-1165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
212	CP88-1179					0	0	0	0	0	0	0	0
213	CP88-1532					0	0	0	0	0	0	0	0
214	CP88-1696					0	0	0	0	0	0	0	0
215	CP88-1700					0	0	0	0	0	0	0	0
216	CP88-1726					0	0	0	0	0	0	0	0
217	CP88-1912					0	0	0	0	0	0	0	0
218	CP88-2017					0	0	0	0	0	0	0	0
219	CP89-1288					0	0	0	0	0	0	0	0

7. Anexos

220	CP89-1325					0	0	0	0	0	0	0	0
221	CP89-1327					0	0	0	0	0	0	0	0
222	CP89-1344					0	0	0	0	0	0	0	0
223	CP89-1417					0	0	0	0	0	0	0	0
224	CP89-1431					0	0	0	0	0	0	0	0
225	CP89-1436					0	0	0	0	0	0	0	0
226	CP89-1528					0	0	0	0	0	0	0	0
227	CP89-1538					0	0	0	0	0	0	0	0
228	CP89-1551					0	0	0	0	0	0	0	0
229	CP89-1606					0	0	0	0	0	0	1	5
230	CP89-1632					0	0	0	0	0	0	2	5
231	CP90-1204					0	0	0	0	0	0	0	0
232	CP90-1222					0	0	0	0	0	0	0	0
233	CP90-1294					0	0	0	0	0	0	0	0
234	CP91-1450					0	0	0	0	0	0	0	0
235	CP91-1560					0	0	0	0	0	0	0	0
236	CP91-1564					0	0	0	0	0	0	0	0
237	CP91-1941					0	0	2	5	0	0	0	0
238	CP92-1185					0	0	0	0	0	0	0	0
239	CP92-1682					0	0	0	0	0	0	0	0
240	CP92-1780					0	0	0	0	0	0	0	0
241	CP93-1056					0	0	0	0	0	0	0	0
242	CP96-1093					0	0	0	0	0	0	0	0
243	CP96-1552					0	0	0	0	0	0	0	0
244	CP99-1989					0	0	0	0	0	0	0	0
245	CPCL02-1546					0	0	0	0	0	0	0	0
246	CPCL02-2186					0	0	0	0	0	0	0	0
247	CPCL05-1504					0	0	0	0	0	0	0	0
248	HoCP02-639					0	0	0	0	0	0	0	0
249	IJ76-521	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	Ja64-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251	L68-40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
252	L77-40					0	0	0	0	0	0	0	0
253	L80-38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
254	LM2002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
255	Mex53-142					0	0	0	0	0	0	0	0
256	Mex57-683	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
257	Mex58-326					0	0	0	0	1	5	0	0
258	Mex68-2243					0	0	0	0	0	0	0	0
259	My5464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
260	NA56-42					0	0	0	0	0	0	0	0
261	NA56-75					0	0	0	0	0	0	0	0
262	P33-11					0	0	0	0	0	0	0	0
263	PGM89-121					0	0	0	0	0	0	0	0
264	POJ2878					0	0	0	0	0	0	0	0

7. Anexos

265	PPQK					0	0	1	5	0	0	0	0
266	PR61-632	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
267	PR71-358					0	0	0	0	0	0	0	0
268	PR75-2002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
269	PR77-3031					0	0	0	0	0	0	0	0
270	PR78-3025	0	0	0	0	0	0	2	5				
271	PR87-2073	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5
272	PR87-2078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	PR87-2080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
274	Q107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	Q124					0	0	0	0	0	0	0	0
276	Q96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
277	RB73-2908					1	3	0	0	0	0	0	0
278	SP71-6180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
279	SP79-1287					0	0	0	0	0	0	1	4
280	SP80-1842					0	0	0	0	0	0	0	0
281	SP81-3250					0	0	0	0	0	0	0	0
282	SP83-2847					0	0	0	0	0	0	0	0
283	Tuc68-19					0	0	0	0	0	0	0	0
284	UCW5407	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
285	CG03-292			0	0	0	0	0	0	1	6	0	0
286	CG95-125	0	0	8	5	0	0	0	0	18	7	0	0
287	CG96-01	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	1	3
288	CG96-135	0	0	0	0	10	7	1	5	40	7	1	5
289	CG96-42	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	0	0
290	CG96-52	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	0	0
291	CG97-100					0	0	1	5	5	7	0	0
292	CG97-97	10	7	20	6	10	7	35	7	45	7	15	5
293	CG98-47					0	0	0	0	15	7	0	0
294	CG99-007					0	0	5	5	25	7	1	5
295	CG99-023					0	0	0	0	10	7	0	0
296	CGSP98-05					0	0	0	0	11	6	0	0
297	CGSP98-09					0	0	0	0	2	6	0	0
298	CP02-1003					5	7	5	5	35	6	5	7
299	CP57-603	10	7	0	0	38	7	32	6	0	0	6	5
300	CP91-2087					0	0	0	0	10	7	0	0
301	Mex60-676					0	0	0	0	20	7	10	5
302	PR67-1355					0	0	0	0	5	6	0	0
303	PR87-2048	0	0	0	0	0	0	0	0	20	8	5	5
304	RB72-1012					0	0	1	5	0	0	5	6
305	SP71-6161					0	0	0	0	8	7	0	0