



Facultad de Ciencias Agrarias



**MAESTRÍA EN  
GENÉTICA VEGETAL**  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
INTA

**Aplicación de mutagénesis *in vitro* en genotipos INTA de caña de azúcar para la generación de variabilidad genética**

**Valentina Di Pauli**



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**APLICACIÓN DE MUTAGÉNESIS *IN VITRO* EN GENOTIPOS  
INTA DE CAÑA DE AZÚCAR PARA LA GENERACIÓN DE  
VARIABILIDAD GENÉTICA**

**Valentina Di Pauli**

**Tesis para optar al título de Magister en Genética Vegetal**

**Área Mejoramiento Genético**

**Directora: Dra. Dalia Marcela Lewi**

**Co- Directora: Dra. Paola Daniela Fontana**

**2020**

**APLICACIÓN DE MUTAGÉNESIS *IN VITRO* EN GENOTIPOS INTA DE CAÑA DE  
AZÚCAR PARA LA GENERACIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA**

**Valentina Di Pauli**

**Licenciada en Biotecnología – Universidad Nacional de Tucumán**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magíster en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria Famaillá del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, en Tucumán, Argentina, durante el período comprendido entre marzo de 2017 a julio de 2020, bajo la dirección de la Dra. Dalia Marcela Lewi y la co-dirección de la Dra. Paola Daniela Fontana.

Valentina Di Pauli

Dalia Marcela Lewi

Paola Daniela Fontana

Defendida: 17 de diciembre de 2020.

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de posgrado en tan prestigiosa institución.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por otorgarme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis y brindarme los recursos necesarios para mi formación académica.

A mis Directoras, Dalia y Paola, quienes me guiaron durante el desarrollo de este trabajo, brindándome total libertad y confianza, y por transmitirme su valioso conocimiento y experiencia con absoluta incondicionalidad.

A Luis Erazzú y Valeria Etchart por sus importantes aportes.

A la Chacra Experimental Agrícola Santa Rosa por contribuir a mi formación práctica.

A mis compañeros del Grupo Caña de Azúcar de INTA por su amistad y valiosas contribuciones a este trabajo.

A Sol, Gerardo, Luis, Miguel y Alejandro por su grata compañía y ayuda con las tareas de invernáculo y campo.

A mis compañeros de posgrado por los buenos momentos compartidos durante el cursado.

A mis amigos y compañeros de INTA, fueron el complemento perfecto para esta etapa de mi carrera. Por cada uno de los comentarios compartidos.

A mis amigos de la vida que siempre me acompañan y brindan su preciosa amistad.

A mi padre, hermanos y toda mi familia por alentarme siempre a seguir adelante y por su permanente apoyo.

A mi madre, por ser un pilar fundamental en mi vida tanto para mi desarrollo personal como profesional, y por el inmenso amor que me brinda.

*A mi abuela Dora*

## Publicaciones y Presentaciones a Congresos

- ❖ Trabajo presentado en formato póster en el XVII Congreso Latinoamericano de Genética, Mendoza, Argentina. 06 al 09 de octubre de 2019:

Di Pauli V, Fontana P, Lewi D, Erazzú L. 2019. Efecto del etil metanosulfonato sobre la capacidad embriogénica y la regeneración *in vitro* en caña de azúcar. *Journal of Basic and Applied Genetics I*. Vol XXX Suppl. (1): 326.

- ❖ Conferencia y trabajo completo presentado en el Congreso Mundial de la Caña de Azúcar “XXX ISSCT Congress”. Tucumán, Argentina. 31 de agosto al 06 de septiembre de 2019:

Di Pauli V, Fontana P, Lewi D, Felipe A, Erazzú, L. 2019. Somatic embryogenesis response in Argentinian sugarcane genotypes for *in vitro* mutagenesis application. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. Vol 30: 522-529.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	2
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>1- INTRODUCCIÓN</b>	
1.1- La caña de azúcar	4
1.1.1- Origen y clasificación botánica	4
1.1.2- Anatomía y morfología	5
1.1.3- Cultivo y fases fenológicas	6
1.1.4- Productos de la agroindustria sucro-alcoholera	8
1.1.5- Importancia económica	8
1.1.6- Sistema productivo en Argentina: la caña de azúcar en Tucumán	9
1.2- Mejoramiento genético de la caña de azúcar	11
1.2.1- Historia	11
1.2.2- Cultivares modernos	13
1.2.3- Programa de mejoramiento genético de INTA	14
1.2.4- Limitaciones y perspectivas en el mejoramiento de caña azúcar	16
1.3- Biotecnología aplicada a la caña de azúcar	18
1.3.1- Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales y embriogénesis somática	19
1.3.2- Variación somaclonal	21
1.3.3- Mutagénesis inducida y agentes mutagénicos	22
1.3.4- Mutagénesis <i>in vitro</i>	24
<b>Hipótesis y objetivos</b>	26
<b>2- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1- Respuesta a la embriogénesis somática de genotipos de caña de azúcar de INTA	27
2.1.1- Material vegetal	27
2.1.2- Acondicionamiento de plantas donantes	28

2.1.3- Medios de cultivo	29
2.1.4- Establecimiento de explantes	29
2.1.5- Inducción de callos embriogénicos	30
2.1.6- Regeneración de plantas	31
2.1.7- Aclimatación en invernáculo	32
2.1.8- Trasplante a campo	32
2.1.9- Análisis estadístico	33
2.1.10- Selección de un genotipo para tratamientos mutagénicos	34
2.2- Inducción de mutaciones en cultivo <i>in vitro</i>	34
2.2.1- Elección del agente mutagénico	34
2.2.2- Tratamientos mutagénicos	34
2.2.3- Regeneración y aclimatación de plantas	36
2.2.4- Análisis estadístico	37
2.2.5- Estimación de la Dosis Letal Media (DL50)	37
2.3- Evaluación de la variabilidad generada por los tratamientos mutagénicos y el cultivo <i>in vitro</i>	39
2.3.1- Evaluaciones en condiciones de invernáculo	39
2.3.2- Evaluaciones a campo	39
2.3.3- Estimación de los parámetros fenotípicos y genotípicos	42
 <b>3- RESULTADOS</b>	
3.1- Respuesta diferencial de los genotipos de caña de azúcar de INTA a la embriogénesis somática	45
3.1.1- Capacidad de establecimiento de los explantes	45
3.1.2- Porcentaje de callo embriogénico	46
3.1.3- Capacidad embriogénica de los genotipos	49
3.1.4- Capacidad de regeneración de los callos	50
3.1.5- Análisis de correlación entre la capacidad de establecimiento, la capacidad de regeneración, capacidad embriogénica y Porcentaje de callo Tipo 3	53
3.1.6- Capacidad de aclimatación en condiciones de invernáculo	53
3.1.7- Supervivencia de las plantas en el campo	55

3.1.8- Selección del genotipo con mejor respuesta a la embriogénesis somática y al cultivo <i>in vitro</i>	56
3.2- Mutagénesis <i>in vitro</i> en el genotipo INTA CP 98-828	57
3.2.1- Efecto de la dosis de EMS sobre la capacidad embriogénica	57
3.2.2- Efecto de la dosis de EMS sobre la proliferación del callo embriogénico	58
3.2.3- Efecto de la dosis de EMS sobre la regeneración de plantas	61
3.2.4- Estimación de la DL50 de EMS para la capacidad de recuperación de callos y para la regeneración de plantas	63
3.3- Evaluación de la variabilidad generada por los tratamientos mutagénicos y el cultivo <i>in vitro</i>	64
3.3.1- Evaluación fenotípica en condiciones de invernáculo	64
3.3.2- Evaluación fenotípica en condiciones de campo	65
3.3.2.1- Análisis de la población total de plantas	65
3.3.2.2- Estimación de la variación $\sigma^2_b$ y $\sigma^2_w$	66
3.3.2.3- Análisis de la variabilidad dentro de cada tratamiento y estimación del grado de determinación genética	67
3.3.2.4- Análisis general y elección de la dosis óptima de mutágeno para generar variabilidad	75
<b>4- DISCUSIÓN</b>	
4.1- Respuesta de los genotipos de caña de azúcar de INTA a la embriogénesis somática	76
4.1.1- Elección de los explantes y capacidad de establecimiento de los genotipos	77
4.1.2- Dependencia del genotipo en la producción de callo embriogénico	78
4.1.3- Efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción y maduración del callo embriogénico	80
4.1.4- Discusión sobre el origen unicelular de los embriones somáticos	81
4.1.5- Capacidad de regeneración de los genotipos	82
4.1.6- Correlación entre la producción de callo embriogénico y la capacidad de regeneración	84
4.1.7- Aclimatación a las condiciones <i>ex vitro</i> y sobrevivencia en el campo	84
4.2- Tratamiento mutagénico <i>in vitro</i> en el genotipo INTA CP 98-828	85
4.2.1- Efecto de la dosis de EMS sobre los callos embriogénicos de INTA CP 98-828	86
4.2.2- Efecto de la dosis de EMS sobre la regeneración de INTA CP 98-828	87

4.2.3- Dosis letal media (DL50)	89
4.3-Evaluación de la variabilidad generada por los tratamientos mutagénicos y el cultivo <i>in vitro</i>	90
4.3.1- Análisis de la variación dentro de los tratamientos y parámetros genéticos	93
<b>CONCLUSIONES</b>	96
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	98
<b>ANEXO I: Análisis estadísticos</b>	110
<b>ANEXO II: Información complementaria</b>	123

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2,4-D	2,4- diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIB	Ácido indol-3-butírico
ARS-USDA	Agricultural Research Service - United States Department of Agriculture
CID	Compound Identity – Pubchem database
CP	Canal Point
cv.	Cultivar
DL50	Dosis letal media
FAM	Famaillá
GDG	Grado de determinación genética
GLM	Modelos Lineales Generalizados
EMS	Etil metanosulfonato
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
L	Louisiana
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)
Mt	Millones de toneladas
M <sub>1</sub> V <sub>1</sub>	Primer generación vegetativa tratada con mutágeno
NA	Norte Argentino
NCo	Natal -Coimbatore
PMGCA	Programa de Mejoramiento Genético de Caña de azúcar
POJ	Proefstation Oost Java
Pol%ca	Pol por ciento en caña
Prueba DGC	Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves
RFT	Rendimiento fabril teórico
S <sub>1</sub> V <sub>1</sub>	Primer generación vegetativa de reproducción <i>in vitro</i>
SID	Substance Identity – Pubchem database
WT	Wild type

## RESUMEN

El mejoramiento genético de caña azúcar se enfrenta a su complejo genoma, la estrecha base genética y la baja fertilidad de los cultivares modernos que dificultan la obtención de genotipos superiores. La mutagénesis *in vitro* es una herramienta alternativa para generar variabilidad genética, combinando la variación somaclonal generada por el cultivo *in vitro* y la inducción de mutaciones. Por otro lado, la embriogénesis somática es una excelente vía de regeneración de plantas mutantes, ya que disminuye la frecuencia de aparición de quimeras. En caña de azúcar, la formación de callos embriogénicos y la regeneración de plantas varían según el genotipo. En este trabajo, se estudió la respuesta a la embriogénesis somática de cinco genotipos desarrollados y/o seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Caña de azúcar de INTA, con el objetivo de identificar genotipos adecuados para la aplicación de mutagénesis *in vitro*. Los genotipos mostraron una gran variabilidad en su respuesta a las diferentes etapas de cultivo *in vitro*. Cuatro de los genotipos de INTA formaron callos embriogénicos y regeneraron plantas con alta capacidad de aclimatación y supervivencia en el campo. El cultivar INTA CP 98-828 mostró la mejor respuesta y fue seleccionado para los tratamientos mutagénicos. La optimización de la dosis de mutágeno adecuada es un paso fundamental en la mutagénesis *in vitro*. En este estudio, se expusieron callos embriogénicos del genotipo INTA CP 98-828 a diferentes dosis (0, 8, 16, 32 y 48 mM) de etil metanosulfonato (EMS) durante 3 h para inducir variación genética. Los resultados mostraron diferencias significativas en la capacidad de recuperación, la sensibilidad de los callos al mutágeno y la capacidad de regeneración entre las dosis de EMS evaluadas. Las concentraciones de EMS  $\leq$  32 mM fueron adecuadas para regenerar un número óptimo de plantas normales en el cv. INTA CP 98-828, encontrándose por debajo de las DL50 determinadas para la regeneración de plantas y recuperación de callos embriogénicos. Las cuatro poblaciones (0, 8, 16 y 32) de somaclones y/o plantas mutantes obtenidas se evaluaron fenotípicamente a campo, para una exploración preliminar de la variación genética generada mediante el cultivo *in vitro* y/o la aplicación de EMS. Los resultados demostraron que la dosis 32 mM presentó mayor variabilidad genética entre las dosis de EMS, con valores medios a altos de heredabilidad en sentido amplio, sin un efecto en detrimento de los caracteres culturales y de calidad evaluados, incluso con incrementos de la media poblacional respecto al genotipo *wild type* en algunos atributos. Estos resultados presentan la posibilidad de aprovechar este enfoque para introducir nuevas variantes genéticas en el Programa de Mejoramiento Genético de Caña de azúcar de INTA.

**Palabras claves:** etil metanosulfonato, variación somaclonal, *Saccharum* spp., embriogénesis somática.

## ABSTRACT

### ***In vitro* mutagenesis in INTA sugarcane genotypes to generate genetic variability.**

The sugarcane genome complexity, the narrow genetic base and poor fertility are limitations for conventional breeding. *In vitro* mutagenesis is an alternative tool to generate variability involving both somaclonal variation and induced mutations. Furthermore, somatic embryogenesis offers an efficient way for avoiding chimera occurrence but it is highly genotype-dependent. In this study, somatic embryogenesis response of five INTA genotypes was investigated in order to achieve an efficient *in vitro* mutagenesis. Four out of five INTA genotypes were able to form embryogenic calluses and regenerated plants. The cv. INTA CP 98-828 showed the best *in vitro* response and it was selected for mutagen treatments. Embryogenic calluses were exposed to different doses of EMS to induce genetic variation. EMS concentrations  $\leq 32$  mM were suitable to regenerate an optimum number of plants. Four somaclonal-mutant plants populations were phenotypically evaluated in the field for a preliminary assessment of genetic variation generated by *in vitro* mutagenesis. Field assessments evidenced that the 32 mM EMS dose showed the highest genetic variability without a detrimental effect on agronomic and quality traits. These results show the prospect of exploiting this approach in INTA Sugarcane Breeding Program.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1- La caña de azúcar

### 1.1.1- Origen y clasificación botánica

La caña de azúcar es una antigua fuente de energía para los seres humanos. Es originaria del sudeste de Asia, incluyendo el archipiélago malayo, Nueva Guinea, India y algunos de los grupos de islas de Melanesia (Moore et al., 2013). Alrededor de 325 a.C. ya era un cultivo importante en la India. Fue introducida en Egipto a mediados del siglo VII, y un siglo después, en España por los árabes. Su introducción en el continente americano ocurre en 1493 con el segundo viaje de Cristóbal Colón (Figueiredo, 2010). Desde entonces, su cultivo se extendió mundialmente a todas las regiones tropicales y subtropicales, entre la latitud 35° N y 35° S del ecuador (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011).

Botánicamente, pertenece a la familia Poaceae, tribu Andropogoneae, sub-tribu Saccharinae y género *Saccharum*. Este último está compuesto, de acuerdo a la taxonomía convencional, por seis especies reconocidas: dos silvestres *S. spontaneum* y *S. robustum*, y cuatro cultígenos a los que se les ha otorgado el estatus de especie, *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. edule* y *S. barberi* (Daniels y Roach, 1987; Moore et al., 2013). Los cultivares modernos (*Saccharum* spp.) son el resultado de hibridaciones interespecíficas entre estas especies, siendo *S. officinarum* y *S. spontaneum* las que más contribuyeron al acervo genético de los cultivares actuales (Garsmeur et al., 2018).

*S. spontaneum* posee tallos delgados y un bajo contenido de sacarosa, pero muestra resistencia a las enfermedades, tolerancia al estrés y gran adaptabilidad (Daniels y Roach, 1987). *S. robustum* fue el resultado de introgresiones complejas entre *S. spontaneum* y otros géneros, particularmente *Erianthus* y *Miscanthus* (Daniels y Roach, 1987). *S. officinarum*, la “caña noble”, es una especie cultivada con alto contenido de azúcar, originada de la domesticación de *S. robustum* (Bremer, 1961); *S. sinense* y *S. barberi* son híbridos naturales entre *S. officinarum* y *S. spontaneum* (D’Hont et al., 2002); y *S. edule* podría ser un híbrido

intergenérico entre *S. officinarum* o *S. robustum* y un género relacionado, o un mutante de alguna de estas especies (Daniels y Roach, 1987). Estudios de genética molecular más recientes sugieren que *S. spontaneum* difiere lo suficiente de las otras especies e híbridos de *Saccharum* como para retener el rango de especie, mientras *S. robustum* junto a los cuatro cultígenos, permanecerían juntas en una misma especie que podría denominarse en conjunto *S. officinarum* (Irvine, 1999; D’Hont et al., 2002).

### **1.1.2- Anatomía y morfología**

La caña de azúcar es una planta C<sub>4</sub> de alta eficiencia fotosintética. Crece formando matas, la parte aérea está constituida por varios tallos macizos sin ramificar, hojas e inflorescencias y la subterránea por raíces y rizomas (Mozambani et al., 2006).

El tallo es el órgano que interesa desde el punto de vista de la producción de azúcar, ya que en él se almacena la sacarosa que puede llegar a constituir alrededor del 12 al 16% del peso fresco del mismo y cerca del 50% de su peso seco (Bull y Glasziout, 1963). Está formado por segmentos llamados entrenudos, situados entre dos nudos. El nudo contiene una yema lateral, el punto de inserción de la hoja y un anillo de tejido meristemático donde se desarrollan los primordios radiculares. La longitud, el diámetro y el color del tallo en la región de los entrenudos varían considerablemente dependiendo del cultivar y de las condiciones ambientales (Rae et al., 2013). La ramificación es subterránea (rizoma): la brotación inicial origina el tallo primario, de sus yemas basales surgen los tallos secundarios y a su vez, de las yemas basales de éstos los tallos terciarios, cada uno con sus propias raíces (Rae et al., 2013), dando como resultado lo que se conoce como “cepa”.

La hoja está constituida por la lámina con la nervadura central engrosada, la vaina que envuelve al tallo y la unión articulada entre ellas, denominada collar. La anatomía interna es característica de las gramíneas C<sub>4</sub> (Rae et al., 2013). Las hojas se unen a lo largo de todo el tallo formando dos filas opuestas y alternadas (Mozambani et al., 2006). Pueden ser enumeradas de acuerdo al “sistema Kuijper”, la primera hoja desde el ápice que presenta collar visible y está totalmente desenrollada se denomina hoja +1, las hojas más viejas reciben numeración creciente +2, +3, etc., y las más nuevas, en dirección apical, reciben la numeración 0, -1, -2, etc. (Salles Scarpari y Gomes, 2010).

La inflorescencia es una panícula terminal en forma de espiga, constituida por un eje principal con articulaciones donde se insertan las espiguillas, que contienen una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas (Salles Scarpari y Gomes, 2010; Rae et al., 2013). La floración es importante desde el punto de vista del mejoramiento genético y un proceso indeseable para la producción comercial (Bonnett, 2013). Los desencadenantes ambientales y los procesos de señalización que inducen la floración son complejos. Para la inducción floral son necesarias condiciones específicas de fotoperiodo, temperatura y humedad (Salles Scarpari y Gomes, 2010).

### 1.1.3- Cultivo y fases fenológicas

En condiciones comerciales, la caña de azúcar es una planta semiperenne de cosecha anual, que se desarrolla bajo condiciones de alta exposición solar, altas temperaturas y grandes cantidades de agua (Moore et al., 2013). Se reproduce asexualmente a partir de la brotación de las yemas laterales de la “caña semilla” (fragmento de tallo o esqueje, con una o más yemas). Se denomina "caña planta" cuando se encuentra en su primer año y "socas" a los posteriores rebrotes, así soca 1, soca 2, soca 3, de acuerdo a la edad de la misma. El ciclo caña-planta comienza con la plantación y termina después de la primera cosecha, y el ciclo de socas comienza después de la cosecha de la caña-planta y continúa con las cosechas sucesivas hasta la renovación del cañaveral (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). La plantación dura aproximadamente cinco años según el nivel de rendimiento que presente.

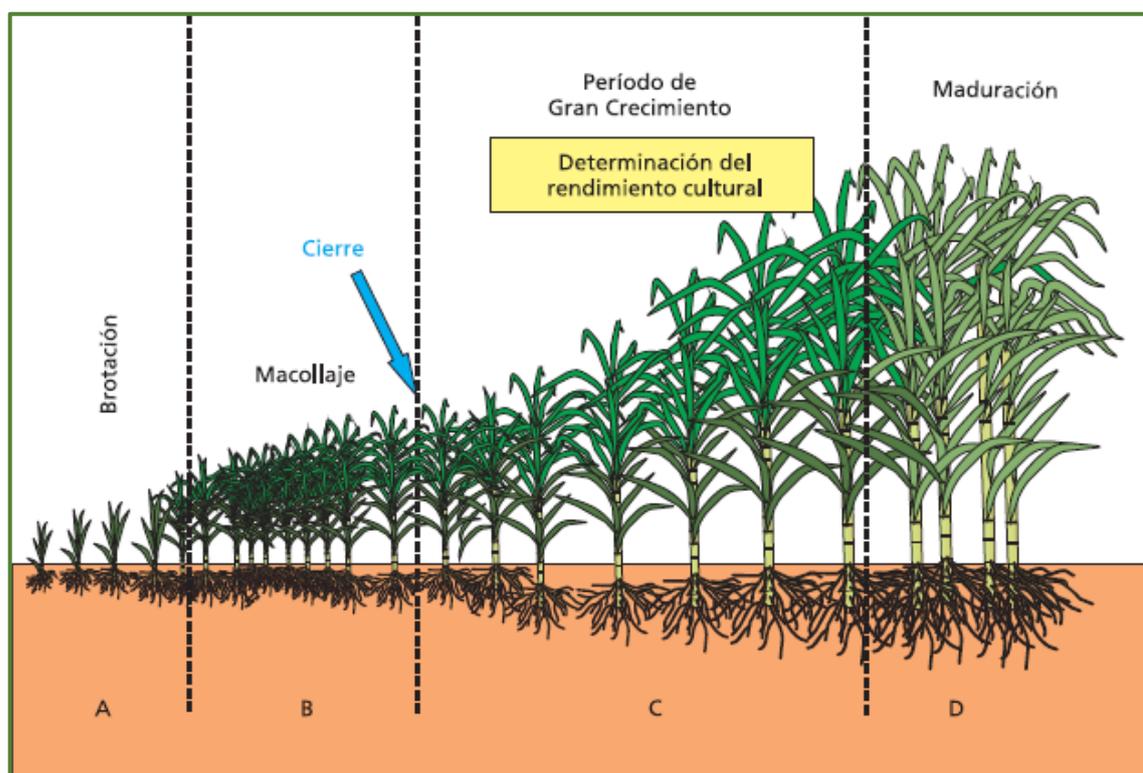
Cada ciclo de cultivo se divide en cuatro fases fenológicas que caracterizan el desarrollo y crecimiento de la caña de azúcar a nivel comercial (Figura 1.1):

**A- Brotación:** Se caracteriza por la emergencia y el establecimiento de la población inicial de tallos primarios, con una altura mínima mientras se incrementa el número de hojas verdes por tallo (Romero et al., 2009).

**B- Macollaje:** Aumenta rápidamente la población total de tallos y se establece el número potencial de tallos cosechables, por lo tanto, es de gran importancia en la definición del rendimiento. A mitad de esta fase, se produce un drástico cambio en el ritmo de elongación, que coincide con la finalización del macollaje y el **cierre** del cañaveral (Romero et al., 2009).

**C- Período de gran crecimiento:** Se define la producción de caña al determinarse la población final de tallos molibles y el peso fresco por tallo. Luego del cierre del cañaveral, el macollamiento excesivo en la fase anterior genera una condición de competencia por la luz y los nutrientes, lo que conduce a la muerte de algunos tallos (Bonnett, 2013). Además, se inicia el almacenamiento de azúcar en los entrenudos que van completando su desarrollo. En esta etapa se alcanza el índice de área foliar máximo y de acumulación de biomasa (Romero et al., 2009).

**D- Maduración:** En esta fase se define el contenido final de sacarosa en los tallos y la producción de azúcar, acompañado por una disminución del ritmo de elongación caular y del área foliar por senescencia (Romero et al., 2009). Los factores que favorecen el almacenamiento de sacarosa son aquellos que inhiben el crecimiento de la planta, entre ellos la presencia de noches frescas y días calurosos y secos.



**Figura 1.1:** Fases fenológicas del cultivo comercial de caña de azúcar. Fuente: Romero et al. (2009).

#### **1.1.4- Productos de la agroindustria sucro-alcoholera**

El azúcar es uno de los principales productos de la cadena de valor de la caña de azúcar. Es el producto resultante de la purificación, concentración y cristalización de los jugos de la caña. Los cristales de sacarosa así obtenidos conforman el azúcar crudo, el cual puede ser enviado a la refinería para la obtención de azúcar blanco o destinado a exportación (Centro azucarero argentino, 2019).

En los últimos años, debido al creciente interés global por la búsqueda de alternativas energéticas y a partir de la instrumentación de leyes de biocombustibles, el etanol pasó a ser uno de los derivados más importantes de la caña. Por fermentación de la melaza o a partir de biomásas lignocelulósicas, se obtiene el etanol de primera (1G) y de segunda generación (2G), respectivamente.

Los subproductos de la industria azucarera son la melaza, la vinaza, la cachaza y el bagazo, los cuales actualmente ofrecen un enorme potencial. La melaza, es un líquido espeso usado como sustrato de fermentación para la elaboración de alcohol 1G y como alimento para el ganado. La cachaza y la vinaza se utilizan como fertilizantes. Y el bagazo, residuo de la molienda, se utiliza para generar energía eléctrica en el ingenio, en la fabricación de pulpa de papel y como materia prima lignocelulósica para la producción de bioetanol 2G (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011).

#### **1.1.5- Importancia económica**

La caña de azúcar es el principal cultivo sacarífero, ya que contribuye con más del 80% de la producción de azúcar a nivel mundial (FAOSTAT, 2019), el resto proviene de la remolacha azucarera que se cultiva en zonas más templadas, principalmente en Europa. Después de dos temporadas consecutivas de escasez de oferta, la producción mundial de azúcar se recuperó en la campaña de comercialización 2017, con un crecimiento cercano al registrado hace cinco años (OECD/FAO, 2018). La producción mundial de azúcar en la campaña 2018/19 superó las 170 Mt.

El 76% de la producción de azúcar se concentra en países en desarrollo, los principales productores en el mundo son Brasil, India, China, Tailandia, Estados Unidos, Pakistán, México,

Francia, Alemania y Australia (FAOSTAT, 2019). Brasil lidera la producción y exportación de azúcar proporcionando más de una quinta parte de la producción mundial, por lo que sus decisiones de producción afectan directamente la tendencia de los precios (OECD/FAO, 2018). La producción de etanol también es liderada por Brasil, ya que destina 55% de la caña cultivada a la elaboración de alcohol (USDA, 2019).

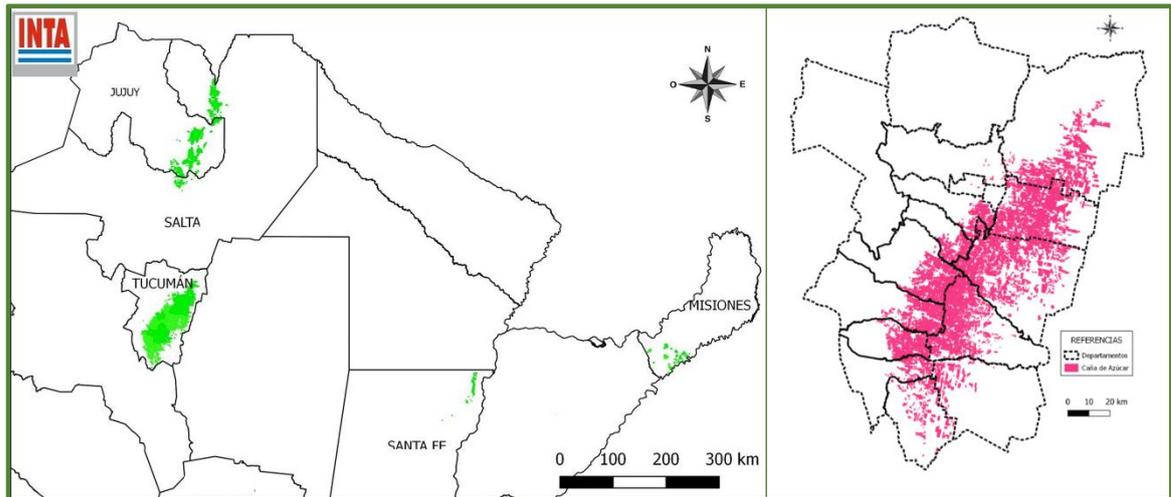
Argentina produce anualmente más de 1,5 Mt de azúcar y se encuentra entre los veinte mayores productores del mundo. En 2017, los ingenios azucareros explicaron el 0,2% de los puestos de trabajo registrado del país y el 1,2% de la industria manufacturera (Ministerio de Hacienda, 2018). La producción de caña de azúcar para la campaña comercial 2018/19 alcanzó las 21,5 Mt en el país, de las cuales 16,8 Mt se utilizaron para la producción de azúcar, y 4,7 Mt para la producción de bioetanol 1G (USDA, 2019). La producción nacional de azúcar y bioetanol en la campaña 2019 alcanzó las 1,66 Mt (USDA, 2019) y 528.162 m<sup>3</sup>, respectivamente (Secretaría de Gobierno de Energía, 2019).

El sector azucarero argentino atiende principalmente al mercado interno con un consumo promedio por habitante de 38,6 kg/año, y procura incrementar la exportación apuntando a lograr aumentos en la producción para convertirse en un exportador permanente de azúcar. En 2018/19, el consumo interno humano representó 1,57 Mt y 187.000 toneladas fueron exportadas (USDA, 2019). El 25% del producto que se destina al mercado interno se consume como tal, y el 75% restante es utilizado como insumo industrial (USDA, 2019). La elaboración de bebidas gaseosas demanda importantes volúmenes de azúcar, al igual que la industria de caramelos, la repostería, los helados, las mermeladas, los lácteos y las frutas en conserva. Por otro lado, la producción de bioetanol creció a partir de la Ley de Biocombustibles. En 2016 se definió un aumento en el corte de bioetanol en naftas del 10% al 12% en beneficio de los ingenios azucareros, lo cual implicó un nuevo salto en la producción.

#### **1.1.6- Sistema productivo en Argentina: la caña de azúcar en Tucumán**

En Argentina, más de 370.000 ha están destinadas al cultivo de caña de azúcar. Como se muestra en la Figura 1.2, la producción se concentra principalmente en el Noroeste (Tucumán, Salta y Jujuy), y en una menor proporción en la zona del Litoral (Santa Fe y Misiones) (Benedetti, 2018). Los ingenios instalados en el país son 23, quince de ellos se encuentran en

Tucumán, tres en Jujuy, dos en Salta, dos en Santa Fe y uno en Misiones (Centro azucarero argentino, 2019). El sistema productivo está bien diferenciado, en Tucumán el 75% de la caña es cultivada por cañeros independientes, mientras que en territorio salteño y jujeño el 80% pertenece a los ingenios. Santa Fe y Misiones incluyen solo productores de pequeña escala.



**Figura 1.2:** Distribución del área cañera en el norte argentino y particularmente en la provincia de Tucumán. Fuente: Benedetti (2018) y Benedetti y Sopena (2020).

Tucumán, con una superficie total de 260.800 ha, que representa un 73% del total plantado, ocupa el primer lugar como superficie productiva (Benedetti, 2018; Benedetti y Sopena, 2020). Este cultivo tiene una gran relevancia socioeconómica por su impacto en la generación de empleo, y por los importantes efectos multiplicadores sobre el resto de la economía regional, además de ser un símbolo de identidad cultural de la provincia. En la campaña 2019/20 se produjeron 1,3 Mt de azúcar y alrededor de 300.000 m<sup>3</sup> de bioetanol (Instituto de Promoción del Azúcar y Alcohol de Tucumán, 2020). La industria sucroalcoholera representa el 30,3% de la industria manufacturera y 5,5 % del total del Producto Bruto Provincial (Ministerio de Hacienda, 2018).

El cultivo de la caña de azúcar se extiende por distintas regiones agroecológicas de la provincia, cada una de ellas posee características fisiográficas, climáticas y edáficas particulares, lo que genera diferentes condiciones y aptitudes para el cultivo. El área cañera se

extiende en las regiones del Pedemonte, la Llanura Deprimida y la Llanura Chaco-pampeana (Figura 1.2). Casi toda el área cañera de Tucumán se encuentra expuesta a la ocurrencia de heladas que pueden provocar pérdidas de la producción de azúcar de entre un 10% y un 25%, por el deterioro de la calidad de la materia prima que se procesa. La producción se basa en el cultivo de distintas variedades que se distribuyen según su adaptación a las diferentes regiones agroecológicas. Actualmente, el 75% de la superficie está cultivada con cv. LCP 85-384, lo cual constituye un riesgo para la sustentabilidad del sector, siendo necesario diversificar el cañaveral con variedades que no superen el 15% de la superficie total (Barbosa y da Silveira, 2015).

Debido a la importancia de la industria sucro-alcoholera en la provincia de Tucumán, es necesario llevar a cabo una intensa tarea de investigación para el desarrollo de nuevas tecnologías más eficientes y mejor adaptadas, tendiente a lograr a mediano plazo, mejoras en la productividad y competitividad del sector.

## **1.2- Mejoramiento genético de la caña de azúcar**

### **1.2.1- Historia**

El primer programa de mejoramiento genético de caña de azúcar comenzó simultáneamente en Java y Barbados en 1888, cuando descubrieron que la caña era capaz de producir semilla sexual viable. A partir de allí la historia del mejoramiento se puede resumir en cuatro etapas importantes (Moore et al., 2013):

1) **Mejoramiento de cañas nobles** mediante cruzamiento y selección de clones de *S. officinarum* ( $2n = 80$ ,  $x = 10$ ; tallos de gran diámetro, hojas anchas, entrenudos cortos, alto contenido de azúcar y bajo contenido de fibra). Se produjeron cultivares nobles, con alto contenido de sacarosa, pero con baja capacidad de macollaje y susceptibles a algunas enfermedades. *S. officinarum* había sido domesticada hace unos 8.000 años a partir de la especie silvestre *S. robustum* (principalmente  $2n = 60$ ,  $80$  y hasta  $200$ ) (Bremer, 1961; Garsmeur et al., 2018).

2) **Mejoramiento para producir los cultivares “nobilizados”** (1920-1930), es decir, hibridación interespecífica de *S. officinarum* con *S. spontaneum* ( $2n = 40-128$ ,  $x = 8$ ; tallos delgados, altamente polimórfica, alta fibra y bajos niveles de azúcar), seguido de repetidas retrocruzas con cultivares nobles, un proceso denominado “nobilización” (Bremer, 1961; Daniels y Roach, 1987). *S. spontaneum* aportó resistencia a la mayoría de las enfermedades, proporcionando vigor para aumentar la tolerancia al estrés abiótico y aumento en la capacidad de macollaje; y mediante las retrocruzas con *S. officinarum* se recuperaron niveles suficientes de contenido de azúcar y tamaño de tallo (Moore et al., 2013). Las primeras etapas de la nobilización se caracterizaron por la transmisión asimétrica de cromosomas  $2n + n$  (Bremer, 1961), siendo las gametas  $2n$  un aporte del progenitor femenino *S. officinarum*.

Un evento clave en la nobilización temprana es el desarrollo del cultivar POJ 2878 en 1921, que se convirtió en la caña mejorada más universal, encontrada en los pedigrí de casi todas las variedades cultivadas en el mundo (Bremer, 1961; Jackson, 2005).

3) **Cruzamientos entre cañas nobilizadas para producir cultivares híbridos.** Esta etapa implicó la explotación de los híbridos interespecíficos que se desarrollaron durante la nobilización, debido a la elevada ganancia genética que los mejoradores encontraron en la selección recurrente de la progenie (Jackson, 2005).

Si bien actualmente los programas de mejoramiento de caña de azúcar difieren en los detalles del diseño del sistema de selección y los criterios para elegir a los progenitores, la mayoría sigue un mismo esquema general de selección recurrente. Se hacen cruzamientos entre padres que fueron seleccionados, ya sea por su desempeño en campo y/o que originaron progenie elite en el pasado. La progenie que surge de estas cruas se ingresa en un sistema de selección clonal con múltiples etapas y finalmente ensayos multiambientales, donde los principales criterios de selección son generalmente el rendimiento de caña, el contenido de sacarosa y la resistencia a las enfermedades. Finalmente, se liberan clones elite que ofrecen características superiores a los cultivares que ya se utilizan comercialmente (Jackson, 2005)

4) **Mejoramiento para ampliar la base genética.** En el desarrollo de los cultivares híbridos se han utilizado unos pocos (15-20) progenitores originales en comparación con la gran cantidad de clones básicos que existen en el género *Saccharum* (Jackson, 2005; Moore et al., 2013). Por lo tanto, la mayoría de los programas de mejoramiento desarrollaron proyectos

para ampliar la base genética, principalmente mediante introgresión de germoplasma exótico, seguida de retrocruzas con *S. officinarum*.

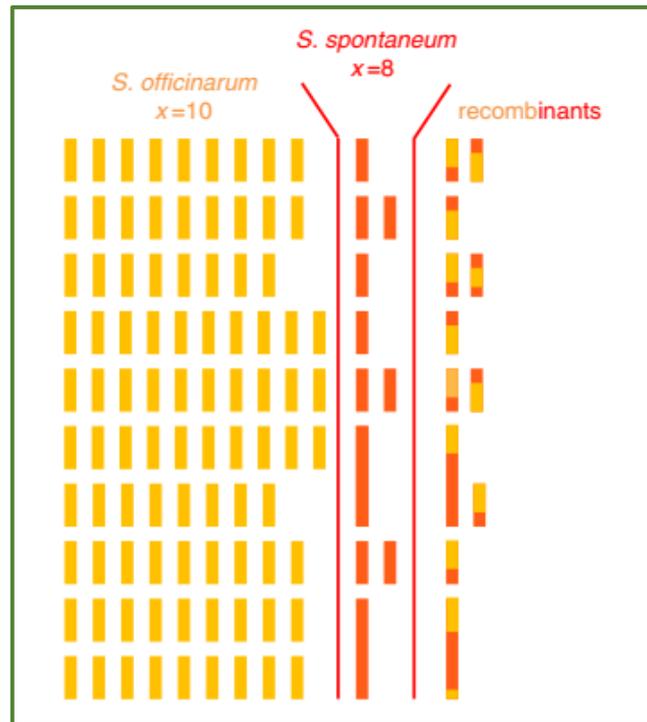
Recientemente, el mejoramiento genético se está enfocando en el desarrollo de genotipos de caña energía (alta fibra) para generar biocombustibles (Dal-Bianco et al., 2012), y más prometedor aún, en cultivos multipropósito con buen contenido de fibra y a la vez alto rendimiento de azúcar (Sabatier et al., 2015).

### 1.2.2- Cultivares modernos

Los cultivares modernos son híbridos interespecíficos, con altos niveles de poliploidía, frecuente aneuploidía, alta heterocigosidad y grandes genomas. El número estimado de cromosomas varía de  $2n = 100$  a 130, distribuidos en 10 a 12 grupos de hom(eo)ólogos, con un tamaño total del genoma poliploide de 10 Gb, mientras que el genoma monoploide tiene aproximadamente 800-900 Mb (Garsmeur et al., 2018).

Como consecuencia de la diferencia en el número básico de cromosomas de *S. officinarum* ( $x = 10$ ) y *S. spontaneum* ( $x = 8$ ), en los cultivares modernos coexisten dos organizaciones cromosómicas distintas. Como se esquematiza en la Figura 1.3, el 10 al 20% de los cromosomas de los cultivares modernos derivan en su totalidad de *S. spontaneum*; 70 a 80% derivan completamente de *S. officinarum*; y alrededor del 10% son el resultado de la recombinación entre los cromosomas de las dos especies ancestrales, con pocos casos de doble recombinación (D'Hont et al., 1996; Piperidis et al., 2010). Además existen diferencias estructurales entre los cromosomas de las dos especies (D'Hont, 2005).

El origen reciente de los cultivares modernos, a partir de una pequeña base genética de germoplasma, seguido de un bajo número de ciclos de cruzamiento y propagación vegetativa, dio como resultado un fuerte desequilibrio de ligamiento debido a la baja frecuencia de eventos de recombinación. Algunos haplotipos están conservados en segmentos que se extienden por al menos 10 cM, mucho mayor que en la mayoría de los otros cultivos (Dal-Bianco et al., 2012; Moore et al., 2013).



**Figura 1.3:** Representación esquemática del genoma de un cultivar moderno típico de caña de azúcar. Cada barra representa un cromosoma, amarillo cuando deriva de *S. officinarum* y naranja de *S. spontaneum*. Los cromosomas en una misma fila son cromosomas homo(eo)ólogos. Fuente: Garsmeur et al. (2018).

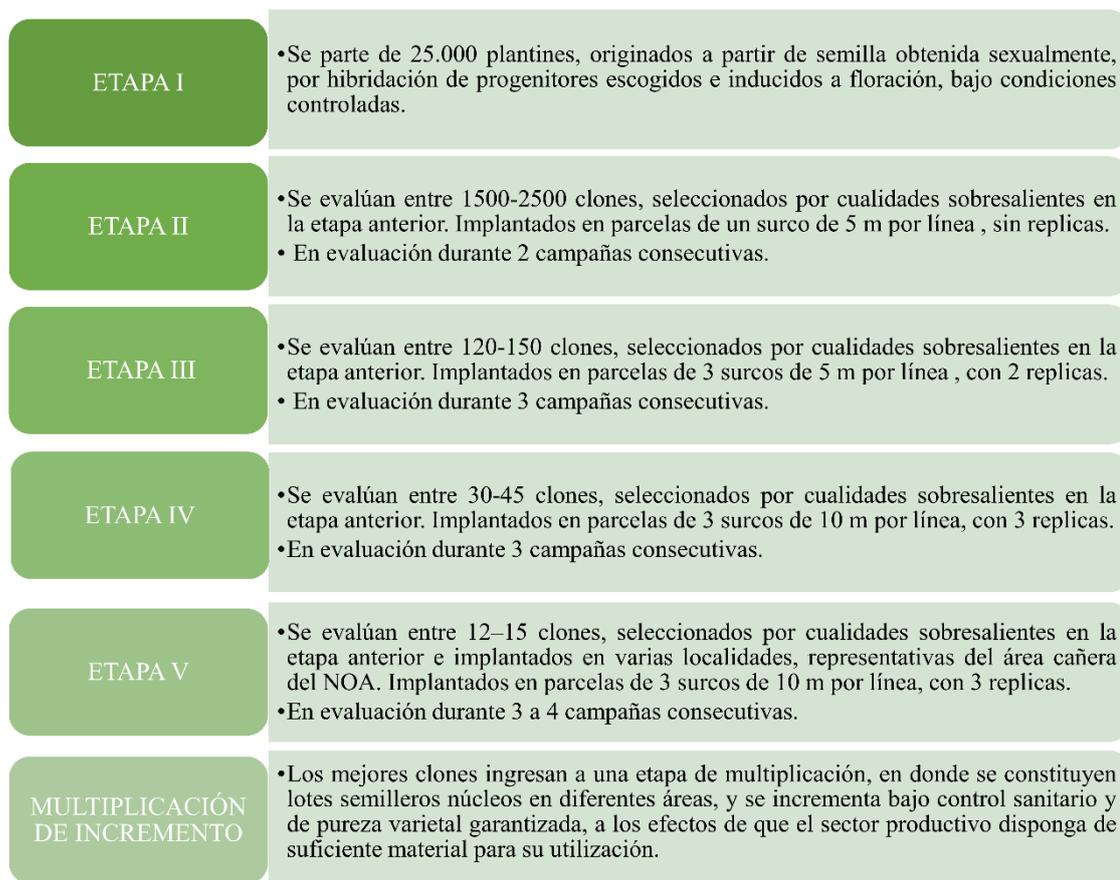
### 1.2.3- Programa de mejoramiento genético de INTA

El mejoramiento genético de la caña de azúcar en Argentina se ejecuta mediante tres programas: la Estación Experimental Agropecuaria Famaillá del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Famaillá INTA) y la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) ubicadas en Tucumán, y la Chacra Experimental Agrícola Santa Rosa (CEASR) que atiende las demandas de Salta y Jujuy.

La EEA Famaillá de INTA cuenta desde sus inicios (1978) con un Programa de Mejoramiento Genético de Caña de Azúcar (PMGCA), siendo el único gestionado desde una organización pública, con cobertura nacional, atendiendo las demandas de la agroindustria en las actuales zonas de producción y potenciales áreas de expansión del cultivo. El programa tiene como objetivo principal generar nuevos cultivares que se adapten mejor a los diferentes ambientes subtropicales y contribuyan a aumentar significativamente el rendimiento cultural y

sacarino por hectárea, con énfasis en la resistencia a estrés biótico y abiótico (Mariotti et al., 2006; Sopena, 2008). Actualmente, también se realizan investigaciones para el desarrollo de genotipos de alta biomasa, así como cultivares multipropósito.

El PMGCA de INTA es pequeño (25.000 plantines/año) pero continuo. Comenzó con la introducción y validación de cultivares de otras regiones cañeras importantes y, posteriormente, con la introducción de semilla botánica desde Sudáfrica, y a través de convenios con importantes centros del mundo como Canal Point - EEUU, y con instituciones públicas y privadas de nuestro país (EEAOC, CEASR). Al presente, se lleva a cabo mediante mejoramiento convencional, a partir de semilla sexual importada y algunos cruzamientos propios, seguido de una selección a campo (etapas clonales) que llega a extenderse entre 12 y 15 años (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Esquema simplificado del programa de mejoramiento genético de caña de azúcar conducido por la EEA Famaillá de INTA. Fuente: Sopena (2008).

Además, el INTA cuenta con una red de evaluación de cultivares (Proyecto RedCaña INTA) pensando en la potencial expansión de la frontera agrícola en regiones no tradicionales y nuevos ambientes de producción (Felipe et al., 2016). Así también, gestiona el Banco Nacional Activo de Germoplasma de Caña de azúcar ubicado en la EEA Famaillá, integrado a la Red de Bancos de INTA (Fontana et al., 2016).

#### **1.2.4- Limitaciones y perspectivas en el mejoramiento de caña azúcar**

Los obstáculos más destacados que se presentan en la mejora de la caña son su estrecha base genética y complejo genoma, además de la baja fertilidad de los cultivares modernos y el largo periodo de selección (12-15 años) (Lakshmanan et al., 2005; Rutherford et al., 2014).

Debido a su alta poliploidía y su origen interespecífico, los cultivares modernos de caña de azúcar son genéticamente muy complejos y, por lo tanto, en cada cruzamiento la combinación de cromosomas de cada individuo es única e impredecible (Snyman, 2004).

La base genéticamente compleja de los cultivares modernos deriva de la cruce de unos pocos materiales sobresalientes, lo cual se tradujo en una reducción de la diversidad genética que ha frenado el progreso de mejora del cultivo (Daniels y Roach, 1987; Jackson, 2005). Los procedimientos habituales, a partir del diseño de combinaciones híbridas apropiadas y la aplicación de procedimientos eficientes de selección, no pueden corregir las falencias genéticas de los materiales fundacionales de la mejora, lo cual condiciona y limita el progreso a mediano y largo plazo (Mariotti, 2015).

La estrategia de cruzar y retrocruzar materiales sobresalientes abordada por la mayoría de los programas de mejoramiento, tiende a incrementar progresivamente la fijación de atributos de producción y calidad, pero disminuyendo la variabilidad genética disponible. Esto resulta exitoso al corto plazo, para dar continuidad a la obtención de nuevos cultivares, pero no resulta sostenible a largo plazo (Mariotti, 2015). Estudios recientes mostraron que los incrementos anuales de rendimiento de azúcar se han vuelto menos pronunciados y se espera que sean aún más bajos en el futuro (Burnquist et al., 2010; Dal-Bianco et al., 2012). Jackson (2005) indica que la ganancia en el rendimiento de azúcar continúa surgiendo a través de ganancias en el rendimiento de caña más que de mejoras en el contenido de azúcar, el cual parece haber alcanzado un *plateau* en términos de mejoramiento. Mariotti (2015) expone que

los altos niveles de heterocigosidad podrían explicar la continuidad de las respuestas en poblaciones derivadas de varias generaciones de apareamientos entre progenitores con proximidad genética, ya que el estado heterocigota puede resultar más eficiente metabólicamente, al contar con una dotación genómica funcional más diversa.

Consecuentemente, la mayoría de los programas de mejoramiento incorporaron proyectos para ampliar la base genética integrando diferentes estrategias. En este sentido, es fundamental el intercambio de material genético con otros programas a nivel mundial. Sin embargo, la introducción de germoplasma se encuentra condicionada por legislaciones de orden nacional e internacional, políticas de derecho de propiedad y periodos de cuarentena que limitan el flujo de intercambio, el cual debe basarse en negociaciones y convenios bilaterales (Snyman et al., 2011). Por otro lado, la introgresión genética es un proceso largo y complejo en caña de azúcar por las características propias de su genoma (Jackson, 2005). A pesar de importantes logros como los cultivares altamente productivos LCP 85-384 en Louisiana y TucCP 77-42 en Argentina, estos programas fueron discontinuos y con relativo poco éxito (Mariotti, 2015). Posiblemente, la principal razón del fracaso de estos programas sea la incapacidad para monitorear o seguir el germoplasma introgresado en una población avanzada (Jackson, 2005; Moore et al., 2013). El desarrollo de marcadores moleculares en caña de azúcar es esencial para este proceso, sin embargo, la falta de conocimientos teóricos y métodos analíticos adecuados para especies poliploides y tan complejas genéticamente, rezagan su avance respecto a los cultivos diploides (Dal-Bianco et al., 2012; de Bem Oliveira et al., 2019).

En Argentina, la situación no dista del panorama mundial. La fuente de germoplasma subtropical empleada en el mejoramiento es una limitante, ya que las colecciones de base no cuentan con suficiente variabilidad genética (Mariotti, 2015) y se ha demostrado, mediante marcadores moleculares, que los materiales mejorados presentan una escasa diversidad genética (Pocoví et al., 2008; Perera et al., 2012). Acevedo et al. (2017), mediante estudios de genealogía de cultivares argentinos, sugieren que el desarrollo de los nuevos cultivares está sesgado por el uso de material recientemente seleccionado, en lugar de la introgresión de genotipos más antiguos y no relacionados genéticamente. No obstante, Acreche et al. (2015) demostraron que aún existe una ganancia genética en atributos importantes como el rendimiento de azúcar.

Para realizar un cruzamiento, el primer requisito es la floración y su sincronización. Para resolver este problema, algunos países como Brasil utilizan áreas donde la caña florece

regularmente. Sin embargo, en países como Argentina los requisitos agroecológicos no son satisfactorios y la floración solo es posible con el uso de cámaras climáticas, donde la temperatura, la humedad, la luz y los nutrientes se controlan adecuadamente (Barbosa y da Silveira, 2015). Junto a la baja fertilidad de los cultivares modernos debido a la selección de genotipos con retraso o ausencia de floración, estos factores son otras barreras que enfrentan los mejoradores en este cultivo (Moore y Berding, 2013).

En los últimos años, los esfuerzos por mejorar la caña de azúcar se han focalizado en la biotecnología (Dal-Bianco et al., 2012). En este sentido, se está comenzando a producir información y tecnologías para ayudar a los mejoradores a incorporar genes útiles de cualquier fuente en el acervo genético de los cultivares avanzados, así como herramientas que generen nueva variabilidad.

### **1.3- Biotecnología aplicada a la caña de azúcar**

La biotecnología se ha vuelto crucial para enfrentar las limitaciones del mejoramiento clásico en caña de azúcar (Suprasanna et al., 2011; Dal-Bianco et al., 2012). En este sentido, ocurrieron avances sustanciales en este cultivo, principalmente en el diagnóstico molecular de patógenos (Wang et al., 2019; 2020a), identificación de cultivares (Singh et al., 2019; Wang et al., 2020b), desarrollo de mapas genéticos (You et al., 2019), cultivo y regeneración *in vitro* (Snyman et al., 2011), desarrollo de plantas transgénicas (Romero et al., 2019) y mutantes inducidas *in vitro* (Rutherford et al., 2014), la comprensión de las bases moleculares de caracteres de interés agronómico, como la acumulación de sacarosa (Verma et al., 2019), y los mecanismos de respuesta al estrés biótico y abiótico (Oloriz et al., 2012; Patade et al., 2012). Sin embargo, la biotecnología en caña de azúcar se encuentra aún rezagada en su avance respecto a otros cultivos de importancia económica (Dal-Bianco et al., 2012). Seguramente, la reciente dilucidación de la secuencia del genoma monoploide del cultivar R570 (Garsmeur et al., 2018) y del genoma haploide de *S. spontaneum* (Zhang et al., 2018), contribuirá al progreso de estrategias de mejoramiento avanzadas, como la selección asistida por marcadores moleculares.

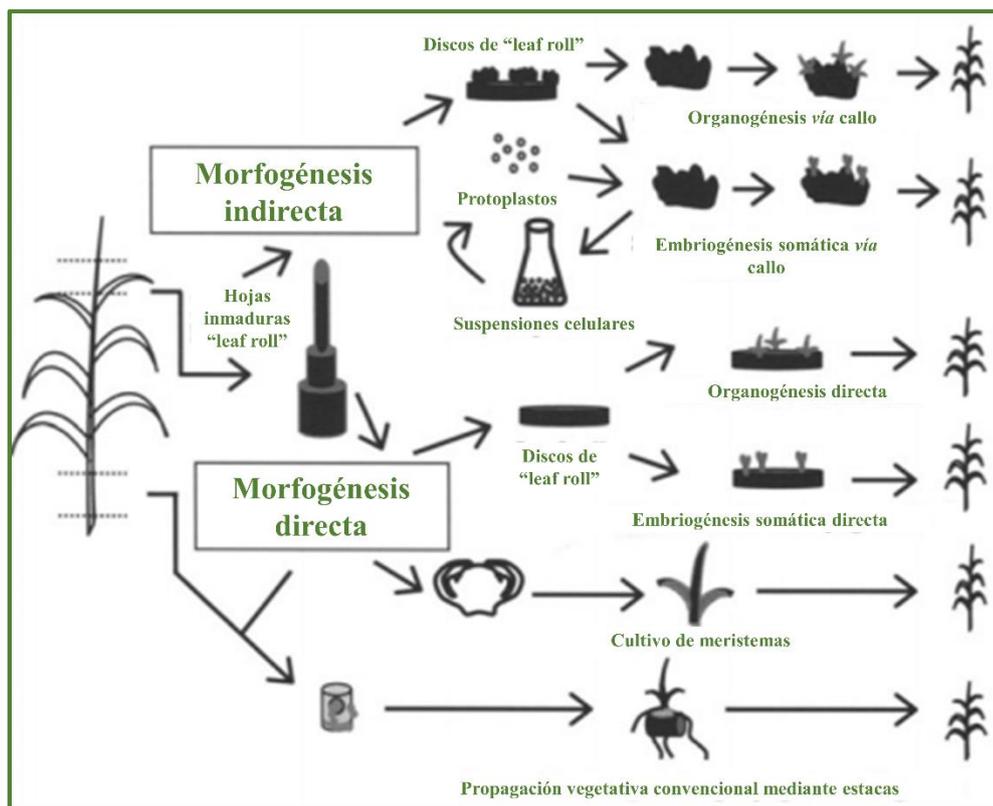
En las últimas décadas se han utilizado diversas técnicas biotecnológicas para generar nueva variabilidad genética, que no involucran cruzamiento sexual. Dentro de estas estrategias,

el cultivo *in vitro* se ha convertido en una herramienta valiosa en caña de azúcar como en muchos otros cultivos de importancia económica. Mediante la aplicación de un agente mutagénico sobre un cultivo *in vitro*, denominada **mutagénesis *in vitro***, se pueden obtener cultivares mejorados para caracteres de interés agronómico que a través del mejoramiento convencional no podrían lograrse. Esta técnica comprende la explotación de la variación somaclonal generada por cultivo *in vitro* de tejidos combinada con la inducción de mutaciones.

### **1.3.1- Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y embriogénesis somática**

Desde la evidencia de la totipotencia de callos de caña de azúcar (Heinz y Mee, 1969), los métodos de cultivo *in vitro* tienen un gran impacto tanto en investigación básica y aplicada, como a nivel comercial (Snyman et al., 2011; Suprasanna et al., 2011). Estos incluyen la micropropagación de cultivares, la producción de material libre de enfermedades, la generación de somaclones agronómicamente superiores y la conservación de germoplasma (Suprasanna et al., 2011). Por otro lado, el cultivo *in vitro* es un paso fundamental, y muchas veces determinante, para el desarrollo de otras tecnologías tales como la transformación genética, la mutagénesis o más recientemente la edición génica.

Como se esquematiza en la Figura 1.5, la caña de azúcar puede ser regenerada por diferentes rutas morfogénicas. La morfogénesis puede ocurrir por vía indirecta o directa, según comprenda o no la formación de una masa de células indiferenciada denominada callo. A su vez, la regeneración *in vitro* puede alcanzarse mediante la formación de órganos *de novo*, organogénesis, o a través de la formación de embriones a partir de células somáticas denominada embriogénesis somática.



**Figura 1.5:** Representación de las diferentes rutas morfogénicas de regeneración *in vitro* de la caña de azúcar. Fuente: Snyman (2004).

La regeneración *in vitro* a través de la **embriogénesis somática** es el método más utilizado en caña de azúcar, con variados protocolos bien establecidos (Snyman et al., 2011). Esta ruta morfogénica es utilizada para la propagación de materiales elite, crio-conservación de germoplasma, generación de variabilidad mediante variación somaclonal y mutagénesis, selección *in vitro* y en el desarrollo de plantas transgénicas.

Ho y Vasil (1983) estudiaron los factores que controlan la formación de callos embriogénicos, su histología, los requerimientos nutricionales y la ontogenia del desarrollo de los embriones en caña de azúcar. Durante la embriogénesis somática los embriones se originan a partir de una única célula, rica en citoplasma, de paredes delgadas, pequeña y compacta, que contiene muchas vacuolas y gránulos de almidón (Haccius, 1978; Nadar et al., 1978; Ho y Vasil, 1983; Guiderdoni y Demarly, 1988; Snyman et al., 2011). Las plantas en cultivo *in vitro* son selectivas a la concentración y la forma química de los iones presentes en los medios de cultivo.

Para la caña de azúcar, se recomienda el empleo de las sales MS (Ho y Vasil, 1983). La embriogénesis somática indirecta requiere auxinas para inducir el desarrollo de los embriones a partir del callo, siendo la hormona 2,4-D la más efectiva (Ho y Vasil, 1983; Ali et al., 2007a; Alcantara et al., 2014). En los estudios de embriogénesis en caña de azúcar se utilizó diversa variedad de explantes (Ho y Vasil, 1983; Taylor et al., 1992; Liu, 1993; Snyman et al., 1996, 2006). Las hojas inmaduras y las inflorescencias en desarrollo son los tejidos preferidos para la producción rápida de callos embriogénicos, debido a la alta prolificidad de sus células (Lakshmanan, 2006).

El genotipo tiene un efecto determinante sobre la posibilidad de inducción de la embriogénesis somática en muchas especies de plantas (Rose y Song, 2017), incluida la caña de azúcar (Liu, 1993; Snyman et al., 1996; Niaz y Quraishi, 2002; Marcano et al., 2002; Gandonou et al., 2005; Alcantara et al., 2014; Kaur y Kapoor, 2016; Mittal et al., 2016; Solangi et al., 2016). Los diferentes cultivares de caña de azúcar generan callos con distinta morfología y capacidad de regeneración (Chen et al., 1988; Taylor et al., 1992). Predominan tres tipos de callos (Ho y Vasil, 1983; Chen et al., 1988; Taylor et al., 1992): a) callo amarillento friable, semi-transparente con células sueltas, grandes y alargadas; b) callo mucilaginoso, gomoso y brillante con células alargadas y altamente disociadas; y c) callo compacto y duro, compuesto de células pequeñas, redondas y ricas en citoplasma, que se vuelve blanco en etapas posteriores. Este último muestra naturaleza embriogénica y fue denominado callo Tipo 3 por Taylor et al. (1992). Además, la capacidad de regeneración es específica y un fenómeno dependiente del genotipo y algunos cultivares de caña de azúcar son recalcitrantes (Heinz y Mee, 1969; Sughra et al., 2014; Kaur y Kapoor, 2016). Por lo tanto, es necesario establecer un sistema de cultivo *in vitro* eficiente para cada genotipo, ya que es un paso crítico para el desarrollo de las técnicas de generación de variabilidad genética.

### **1.3.2- Variación somaclonal**

El término **variación somaclonal** fue presentado por primera vez por Larkin y Scowcroft (1981) para describir cualquier variación genética o epigenética detectada en plantas derivadas de cultivo *in vitro*, independientemente de la ruta morfogénica o explante utilizado. Previamente, Heinz y Mee (1969) habían observado variación genética generada por cultivo de

callos de caña de azúcar y propusieron esta técnica como método para generar cambios a nivel celular. Fue descrita por primera vez en caña y, posteriormente, se aceptó que este tipo de variación existe en la mayoría de las especies y muchos de estos cambios son heredables (Larkin y Scowcroft, 1981). No se conoce aún con precisión la base molecular de la variación somaclonal, sin embargo, se sugieren mecanismos genéticos y epigenéticos. Las fuentes de variación comprenden cambios en el número de cromosomas (poliploidía y aneuploidía), en la estructura cromosómica (translocaciones, deleciones, inserciones y duplicaciones), mutaciones puntuales, alteraciones epigenéticas (silenciamiento o activación de genes) principalmente por metilación del ADN, y activación y/o movilidad de elementos transponibles (Larkin y Scowcroft, 1981; Rutherford et al., 2014). La variación somaclonal se observa principalmente cuando las plantas se producen a través de callos, con altos niveles de auxinas y durante largos periodos de cultivo (Snyman et al., 2011). Las especies con alta y poli ploidía presentan mayor variación comparados con las diploides y haploides (Karp, 1995). Algunos genotipos de caña de azúcar son más propensos a la variación somaclonal que otros y esa inestabilidad *in vitro* es posiblemente consecuencia de la interacción entre el genotipo y el medio de cultivo (Snyman et al., 2011).

La variación somaclonal ha sido utilizada en caña de azúcar para generar nueva variabilidad (Heinz y Mee, 1969; Khan et al., 2008, 2019; Roy et al., 2010; Shahid et al., 2012; Abdullah et al., 2013; Raza et al., 2014) y obtener ciertas características de interés, como tolerancia a estrés salino (Gandonou et al., 2006), estrés hídrico (Wagih et al., 2004; Errabii et al., 2006) y resistencia a enfermedades (Larkin y Scowcroft, 1983; Zambrano et al., 2003a; Singh et al., 2008; Sengar et al., 2009; Kumar et al., 2012)

### **1.3.3- Mutagénesis inducida y agentes mutagénicos**

La mutagénesis es el proceso por el cual la información genética de un organismo es cambiada de forma permanente (Shu et al., 2012). Las mutaciones son el origen primario de la variabilidad genética y, por lo tanto, cierto control sobre su frecuencia y/o espectro puede considerarse una herramienta de gran valor para la obtención de materiales genéticos superiores. La inducción de variabilidad mediante mutagénesis ha sido utilizada ampliamente en la mejora de especies vegetales, comenzando con los trabajos de Stadler en 1930, quien

demonstró el efecto mutagénico de los rayos X en cebada, maíz y trigo. Actualmente, existen en el mundo miles de cultivares inscriptos obtenidos por esta metodología. De acuerdo con la *Mutant Variety Database* (<https://mvd.iaea.org/>) hay 3320 variedades comerciales registradas que tienen su origen en mutaciones. Se incluyen en esta lista, cultivos comerciales de gran importancia económica, como los principales cereales, oleaginosas, así como numerosas especies de hortalizas y cultivos industriales; en dicha base de datos se mencionan 13 variedades de caña de azúcar, la más reciente inscripta en 2005. Mediante irradiación de yemas se alcanzaron resultados prácticos en la obtención de mutantes inducidos de caña de azúcar resistentes a enfermedades, tolerantes al anegamiento y sin floración (Rao, 1966; Majid et al., 2001). Un factor de relevancia es que las variedades obtenidas son de gran aceptación a nivel del consumidor y de libre disponibilidad para propósitos de mejora (Ahloowalia et al., 2004; Snyman et al., 2008).

Entre los diversos agentes mutagénicos que se pueden emplear para generar variabilidad, cada uno tiene características diferentes, en términos del tipo de mutación y la magnitud del cambio que generan (Rutherford et al., 2014). Los mutágenos pueden ser físicos (luz UV, rayos  $\gamma$ , rayos X y neutrones acelerados) o químicos (agentes alquilantes, análogos de bases y azida sódica, entre otros). La radiación se utiliza para producir mutaciones mediante la transferencia de energía. La luz UV provoca la formación de dímeros de pirimidina (TT y CC) que producen mutaciones puntuales, mientras que los rayos X y  $\gamma$  provocan rupturas en los enlaces fosfodiéster, lo que genera mutaciones puntuales y pequeñas deleciones. Los neutrones rápidos causan translocaciones, pérdida de cromosomas y grandes deleciones (Shu et al., 2012). Los mutágenos químicos, generalmente producen mutaciones que conducen a sustituciones de pares de bases. El etil metanosulfonato (EMS) es un agente alquilante que reacciona con los residuos de guanina en sitios aleatorios, agregando un grupo etilo ( $O^6$ -etilguanina) y haciendo que sean reconocidos como adenina durante la replicación del ADN (G:C a A:T) (Leitão, 2012). Con una frecuencia mucho menor, produce transiciones A:T a G:C ( $O^4$ -etiltiamina) y otras lesiones en el ADN (Cuadro 1.1). Los agentes alquilantes, como el EMS, también pueden presentar un efecto clastogénico en plantas (Sega, 1984; Leitão, 2012).

**Cuadro 1.1:** Espectro de mutaciones del agente alquilante EMS a nivel molecular. Fuente: Leitão (2012).

Compuesto	G:C - A:T (%)	A:T - G:C (%)	Transversiones (%)	Otras (%)
EMS	93	1	2	4

### 1.3.4- Mutagénesis *in vitro*

La mutagénesis se ha vuelto más eficiente en combinación con técnicas avanzadas de biología molecular y métodos de cultivo *in vitro* que aportan al progreso de los programas de mejoramiento. La aplicación adicional de un mutágeno al cultivo *in vitro* aumenta la frecuencia de la variación somaclonal y genera diversos cambios en el material genético cuya naturaleza depende del agente mutagénico utilizado (Suprasanna et al., 2011; Rutherford et al., 2014). Las células mutadas *in vitro* tienen el potencial de regenerar una nueva planta y así transmitir sus mutaciones a la siguiente generación, ya sea sexual o vegetativa. El cultivo *in vitro* permite además una disponibilidad de grandes poblaciones de plantas en un espacio y tiempo reducidos, un tratamiento mutagénico más uniforme, alta frecuencia de mutación y la aplicación de agentes selectivos *in vitro* (Geier, 2012; Rutherford et al., 2014). Por su origen unicelular, los embriones somáticos son un excelente blanco para la inducción de mutaciones *in vitro*, ya que en éstos se reduce la frecuencia de aparición de quimeras<sup>1</sup> entre las plantas regeneradas, facilitando la selección de plantas mutantes homohísticas (sólidas) sin tener que separar sectores de tejido mutado (Heinz y Mee, 1969; Geier, 2012; Suprasanna et al., 2012). La dosis adecuada de mutágeno y el tiempo de exposición son factores importantes que afectan la mutagénesis *in vitro* y varían sustancialmente dependiendo del material vegetal expuesto, la especie y el genotipo (Kodym et al., 2012; Jankowicz-Cieslak y Till, 2016). En este punto, es importante determinar la dosis de mutágeno óptima para generar suficientes cambios sin comprometer el desarrollo normal de la planta. Para lograrlo, se recomienda que un tratamiento mutagénico óptimo permita una supervivencia del 40-60% de los callos (Wagih et al., 2004).

<sup>1</sup> Una quimera se define como un individuo que tiene sectores formados por diferentes genotipos celulares. Estas células difieren en la estructura cromosómica o en el número de cromosomas (aneuploidía o ploidía) o incluso en un solo nucleótido dentro del genoma nuclear y/o el genoma de las organelas.

En efecto, tanto mutágenos físicos como químicos han sido utilizados exitosamente sobre callos embriogénicos de caña de azúcar para incrementar la variación somaclonal y generar mutaciones. Los resultados más destacados se obtuvieron mediante radiación  $\gamma$ , mientras que, comparado a la cantidad de trabajos con mutágenos físicos, la mutagénesis inducida químicamente se ha explorado recientemente y se ha limitado a unos pocos estudios con EMS, azida sódica y 5-azacytidina (Ali et al., 2007a; Kenganal et al., 2008; Koch et al., 2012; Oloriz et al., 2011; Sadat y Hoveize, 2012; Mahlanza et al., 2013; Munsamy et al., 2013; Masoabi et al., 2018; Chaisan et al., 2019). Según los reportes, la mutagénesis química se efectúa mediante una metodología simple y sin necesidad de equipos especializados (Suprasanna et al., 2012).

La mutagénesis *in vitro* en caña de azúcar avanza hacia la obtención de mutantes resistentes a enfermedades (Fuchs et al., 2005; Ali et al., 2007b; Oloriz et al., 2011; Mahlanza et al., 2013; Kona et al., 2019), tolerantes a la salinidad (Patade et al., 2006; Kenganal et al., 2008; Nikam et al., 2015), herbicidas (Zambrano et al., 2003b; Koch et al., 2012; Munsamy et al., 2013), déficit hídrico (Khalil et al., 2018; Masoabi et al., 2018; Chaisan et al., 2019) y mejora de características agronómicas como número, longitud y diámetro de tallos (Khan et al., 2000; Oloriz et al., 2011; Nikam et al., 2015; Sandhu et al., 2019). Asimismo, mediante técnicas moleculares como RAPD, AFLP y SSR, se ha detectado la variabilidad generada por mutagénesis (Khan et al., 2007, 2009, 2010; Bibi et al., 2010; Koch et al., 2012; Sadat y Hoveize, 2012; Munsamy et al., 2013).

## **Hipótesis**

Según lo expuesto y teniendo en cuenta la gran dependencia del genotipo de la técnica de mutagénesis aplicada en cultivo *in vitro*, se postula la siguiente hipótesis de trabajo: Los genotipos INTA de caña de azúcar tienen la capacidad de regenerarse por embriogénesis somática indirecta y, mediante la aplicación de un agente mutagénico químico sobre callos embriogénicos de estos materiales, puede generarse variabilidad genética.

## **Objetivo general**

Inducir variabilidad genética en genotipos de caña de azúcar de INTA mediante mutagénesis *in vitro* con la finalidad de incrementar la base genética y el espectro de selección del PMGCA.

## **Objetivos específicos**

- 1- Evaluar la respuesta al cultivo *in vitro*, vía embriogénesis somática indirecta, de genotipos de caña de azúcar de INTA, siguiendo distintos protocolos de inducción de callos y aclimatación en invernáculo.
- 2- Seleccionar la mejor combinación protocolo/genotipo, que se destaque por su respuesta a la embriogénesis somática, para la aplicación de mutagénesis *in vitro*.
- 3- Ensayar tratamientos con distintas dosis del agente mutagénico químico EMS sobre callos embriogénicos del genotipo seleccionado y determinar la dosis letal media (DL50).
- 4- Estimar los efectos de los tratamientos mutagénicos *in vitro* sobre el material en estudio mediante evaluaciones fenotípicas, y determinar la dosis óptima de mutágeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1- Respuesta a la embriogénesis somática de genotipos de caña de azúcar de INTA

La embriogénesis somática es un paso fundamental para el éxito de la mutagénesis *in vitro*, no sólo como estrategia para aportar variabilidad sino también por disminuir la frecuencia de quimeras entre las plantas mutantes. Con el fin de encontrar un material vegetal con buen comportamiento *in vitro* para la aplicación de mutagénesis, se evaluaron cultivares de caña de azúcar de INTA para conocer su respuesta a la embriogénesis somática.

#### 2.1.1- Material vegetal

Se seleccionaron cinco genotipos INTA de caña de azúcar, desarrollados y/o seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético de Caña de azúcar (PMGCA) de la EEA Famaillá de INTA, Tucumán, Argentina. El criterio de elección estuvo basado en las características agronómicas y productivas del cultivar. Se incorporó al estudio, como material de referencia, un genotipo destacado por su capacidad para generar callos embriogénicos y regenerar *vía* embriogénesis somática. En el Cuadro 2.1 se encuentra descripto el origen y las principales características de cada material vegetal utilizado en el estudio.

**Cuadro 2.1:** Genotipos de caña de azúcar de INTA evaluados en su respuesta al cultivo *in vitro*.

Genotipo	Características
INTA NA 89-686	Se originó del cruzamiento entre NCo 310 x NA 73-2596, realizado en Chacra Experimental Santa Rosa, Salta, Argentina y fue seleccionada por el PMGCA de INTA en Tucumán. Porte semi-erecto, follaje verde intenso, con tallos de peso mediano. Presenta una buena cobertura a cosecha y maduración intermedia. Resistencia a mosaico, roya marrón y carbón.

INTA CP 98-828	Se originó del cruzamiento entre CP 82-550 x CP 83-657, realizado en la Estación de Canal Point, Florida, ARS-USDA, EE.UU. y fue seleccionada por el PMGCA de INTA en Tucumán. Porte erecto, de mediana altura, tallo delgado de color amarillento. Maduración de tipo temprana. Buena acumulación de azúcar y tonelaje medio a alto en soca 1 y soca 2. Resistencia media a roya marrón, escaldadura de la hoja y carbón.
INTA NA 91-209	Se originó del cruzamiento entre CP 61-89 x FAM 79-234 realizado en Chacra Experimental Santa Rosa, Salta, Argentina y fue seleccionada por el PMGCA de INTA en Tucumán. Porte semi-erecto y de gran altura, con tallo de diámetro delgado-medio. Rápida emergencia y gran vigor inicial de crecimiento. Maduración de tipo intermedia. Resistencia a mosaico, escaldadura de la hoja, estría roja y carbón.
L 91-281	Se originó del cruzamiento entre CP 78-317 x LCP 81-030 en la Universidad de Louisiana, EE.UU donde fue seleccionada. Fue introducida por el PMGCA de INTA y seleccionada en las condiciones agroclimáticas y de manejo de Tucumán. Porte semi-erecto, abundante follaje verde claro y tallos delgados. Brotación y establecimiento rápido, con buena cobertura en el entresurco. Maduración intermedia. Resistencia a mosaico, roya marrón y carbón.
FAM 81-820	Origen desconocido, fue seleccionada por el PMGCA de INTA en Tucumán. Porte erecto con buen macollamiento, diámetro de tallo promedio. Tendencia al vuelco en caso de alto tonelaje. Buena acumulación de azúcar y tonelaje alto. Contenido de fibra medio-alto. Susceptibilidad media a carbón.
NA 85-1602	Genotipo utilizado como material de referencia, desarrollado por la Chacra Experimental Agrícola Santa Rosa – Salta.

### 2.1.2- Acondicionamiento de plantas donantes

Se utilizaron plantas donantes en edad de “caña planta” (período que va desde la plantación hasta la primera cosecha), provenientes de estacas hidrotermotradas y desarrolladas en el Semillero de caña azúcar de la EEA Famaillá, con los manejos culturales y fitosanitarios adecuados.

### 2.1.3- Medios de cultivo

❖ **Medio basal** (Snyman, 2004): Compuesto por 4,33 g/L de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) (PhytoTechnology Laboratories - M524) suplementado con vitaminas (mioinositol 100 mg/L, piridoxina 0,5 mg/L, ácido nicotínico 0,5 mg/L, tiamina 1 mg/L y glicina 2 mg/L), 20 g/L de sacarosa, 0,5 g/L de caseína, pH  $5,8 \pm 0,1$  (con KOH 1N).

❖ **Medio de inducción de callos (MS3)**: Compuesto por el medio basal con el agregado de 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 9 g/L de agar (Britania Lab, Argentina). Se adicionó 0,4 g/L de cefotaxima sódica en la etapa de establecimiento de explantes.

❖ **Medio de inducción de callos (MS1)**: Compuesto por el medio basal con el agregado de 1 mg/L de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y 9 g/L de agar (Britania Lab, Argentina).

❖ **Medio de regeneración de plantas (MR)**: Se utilizó la misma composición que el medio basal con 5 g/L de agar (Britania Lab, Argentina). Se adicionó 5 mg/L de ácido indol-3-butírico (AIB) cada dos subcultivos.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 min y 1 atm de presión. Las soluciones del regulador vegetal AIB y la cefotaxima sódica, sensibles a la temperatura, fueron filtradas y adicionadas al medio estéril a 50°C.

### 2.1.4- Establecimiento de explantes

Para el establecimiento del material vegetal en cultivo *in vitro* se utilizó como explante el cilindro de hojas inmaduras (denominado *leaf roll* en inglés) que se encuentra en la zona apical de la planta de caña de azúcar.

Se recolectaron a campo cogollos de plantas donantes de siete meses de desarrollo. En el laboratorio, se eliminaron las hojas externas y vainas y se lavó el material con agua corriente. Luego de eliminar una vuelta más de vaina se procedió a una desinfección superficial con etanol 70% (v/v) durante 1 min, seguido de un enjuague con agua destilada y una segunda desinfección con solución de hipoclorito de sodio 18 g/L durante 20 min. Finalmente se realizaron tres

enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito. En cámara de flujo laminar se extrajo el *leaf roll* de cada cogollo y se seccionó asépticamente en pequeños discos, de aproximadamente 1-2 mm de espesor (Figura 2.1). Los explantes fueron colocados en placas de Petri conteniendo medio de cultivo para inducción de callos MS3 suplementado con 0,4 g/L de cefotaxima sódica, bacterostático para evitar la contaminación bacteriana. A continuación, las cajas de Petri se incubaron en oscuridad y en condiciones adecuadas de humedad (>60%) y temperatura ( $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) para inducir la formación de callo mediante desdiferenciación celular.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 16 repeticiones para cada genotipo ( $n = 96$ ). La unidad experimental estuvo representada por la caja de Petri con 14 explantes. Luego de una semana de cultivo, se registró la **capacidad de establecimiento (ES)** definida como el  $[\text{n}^{\circ} \text{ de explantes establecidos} / \text{n}^{\circ} \text{ total de explantes}] \times 100$ . Se consideró explante establecido al que comienza la formación de callo.



**Figura 2.1:** Proceso de extracción de explantes, desde el cogollo hasta la obtención de los discos de *leaf roll*.

### 2.1.5- Inducción de callos embriogénicos

Los explantes fueron cultivados durante ocho semanas y repicados a medio fresco cada dos semanas. Se compararon dos protocolos de inducción de callos: a) ocho semanas en medio MS3 denominado **protocolo MS3** y b) cuatro semanas en medio MS3, seguido de cuatro semanas en medio MS1 denominado **protocolo MS3/MS1**. Este último experimenta una disminución en el regulador vegetal 2,4-D, que podría favorecer la maduración de los embriones somáticos (Nadar et al., 1978).

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con estructura factorial 6×2 (seis genotipos y dos protocolos) con ocho repeticiones ( $n = 96$ ). La unidad experimental estuvo representada por la caja de Petri con 14 callos.

La **capacidad embriogénica (EM)** se registró después de ocho semanas como el  $[\text{n}^\circ \text{ de callos con respuesta embriogénica} / \text{n}^\circ \text{ total de callos}] \times 100$ . El callo embriogénico, denominado Tipo 3 por Taylor et al. (1992), se identificó por su aspecto blanco, compacto y nodular. Por otro lado, cada callo se evaluó visualmente según el **porcentaje del callo Tipo 3 (PT3)** utilizando el siguiente sistema de calificación: 1 = 0-25%; 2 = 25-50%; 3 = 50-75% y 4 = 75-100% de callo Tipo 3 sobre el volumen total del callo. La puntuación por unidad experimental (caja de Petri) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $(a \times 1 + b \times 2 + c \times 3 + d \times 4) / \text{total de callos}$ ; donde los valores  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , y  $d$  corresponden al número de callos con puntuación 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

#### 2.1.6- Regeneración de plantas

La regeneración de plantas se indujo con luz artificial (~3500 Lux) bajo un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los callos embriogénicos fueron transferidos a medio MR suplementando con AIB cada dos subcultivos para promover el desarrollo radicular (Snyman, 2002). Se realizaron subcultivos cada dos semanas a medio fresco hasta la formación de brotes y raíces. Cuando las plantas alcanzaron 1 cm de altura en placa fueron transferidas a frascos hasta obtener una altura de 7-8 cm y un buen sistema radicular desarrollado (aproximadamente 12 semanas) para pasar a condiciones *ex vitro*.

En esta etapa se mantuvo el diseño establecido en la obtención de callos embriogénicos ( $n = 96$ ). La unidad experimental estuvo representada por los frascos provenientes de una misma caja de Petri. La **capacidad de regeneración (RG)** se registró después de 12 semanas como el  $\text{n}^\circ$  de plantas regeneradas/placa de Petri. Además, se registró la **frecuencia de plantas albinas (FA)** como el  $\text{n}^\circ$  plantas con algún grado de albinismo/ $\text{n}^\circ$  total de plantas.

### 2.1.7- Aclimatación en invernáculo

La aclimatación tuvo lugar en invernáculo y posteriormente a campo. Cuando las plantas alcanzaron el desarrollo adecuado en condiciones *in vitro*, se trasplantaron en una mezcla 4:2:1 (v/v) de turba (Kekkilä), tierra estéril y perlita en condiciones de invernáculo. Se aplicó semanalmente 10 g/L de urea, intercalando con fertilización foliar con Yoguen® N°2 (S. Ando y Cía. S.A.) en concentración 4 g/L. El control fúngico se hizo con sulfato neutro de oxiquinoleina 0,5 g/L.

Se ensayaron dos procedimientos de aclimatación: a) las plantas regeneradas se transfirieron a **macetas** transparentes (1 L) y se mantuvieron durante la primer semana en condiciones de alta humedad, cubriéndolas con un plástico fino, perforado diariamente, para evitar la excesiva evapotranspiración en los primeros días de adaptación (Snyman, 2002); y b) las plantas se transfirieron a **bandejas** plásticas, siguiendo el procedimiento utilizado para semilla sexual en caña de azúcar, donde cada planta se trasplantó en una celda individual (92 mL) conteniendo el sustrato y sin ningún tipo de cobertura plástica.

Un total de 1600 plantas fueron evaluadas en un diseño experimental completamente al azar con estructura factorial 2×5×2 (dos procedimientos de aclimatación, cinco genotipos y dos protocolos de inducción) con ocho repeticiones por genotipo con diez plantas cada repetición ( $n = 160$ ). La **capacidad de aclimatación (AC)** se registró después de dos meses como el  $[\text{n}^\circ \text{ de plantas aclimatadas} / \text{n}^\circ \text{ de plantas trasplantadas}] \times 100$ .

### 2.1.8- Trasplante a campo

Se trasplantaron directamente a campo 1000 plantas aclimatadas de tres meses de desarrollo, en un lote experimental de la EEA Famaillá, a una distancia de 60 cm entre plantas y 160 cm entre surcos. El diseño experimental fue completamente al azar con estructura factorial 2×5 (dos procedimientos de aclimatación y cinco genotipos) con cinco repeticiones por genotipo con veinte plantas por repetición ( $n = 50$ ). Los datos de **supervivencia en el campo (SC)** se registraron a los dos meses del trasplante como el  $[\text{n}^\circ \text{ de plantas supervivientes} / \text{n}^\circ \text{ plantas trasplantadas}] \times 100$ .

### 2.1.9- Análisis estadístico

El análisis de datos se llevó a cabo en el marco teórico de Modelos Lineales Generalizados (GLM de las siglas en inglés de *Generalized Linear Models*) (McCullagh y Nelder, 1989). Cada modelo se ajustó teniendo en cuenta la naturaleza de la variable respuesta, la distribución de los datos y la sobredispersión ( $\Sigma (\text{Residuos de Pearson}^2)/\text{grados de libertad} \approx 1$ ) (Crawley, 2013). En el Cuadro 2.2 se muestran las variables analizadas y la familia y función de enlace utilizadas para cada una. Los datos porcentuales de las variables ES, EM, AC y SC se transformaron en frecuencias para el análisis.

Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba DGC (Di Rienzo et al., 2002) y los correspondientes contrastes de hipótesis, con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05.

Además, se realizó un análisis de correlación entre las variables ES, EM, PT3 y RG, mediante el cálculo de los coeficientes de Spearman.

Todos los análisis se llevaron a cabo con el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2017) en su interfaz con el software R versión 3.4.2 (The R-Foundation for Statistical Computing 2018).

**Cuadro 2.2:** Variables analizadas para estudiar la respuesta al cultivo *in vitro* de genotipos de caña de azúcar de INTA.

<b>Variable respuesta</b>	<b>Familia</b>	<b>Función de enlace</b>
Capacidad de establecimiento (ES)	Binomial	<i>logit</i>
Capacidad embriogénica (EM)	Binomial	<i>logit</i>
Porcentaje de callo Tipo 3 (PT3)	Normal*	<i>identity</i>
Capacidad de regeneración (RG)	Binomial negativa	<i>log</i>
Capacidad de aclimatación (AC)	Binomial	<i>logit</i>
Supervivencia en campo (SC)	Binomial	<i>logit</i>

\*Para variables con distribución normal se probaron los supuestos de normalidad en la distribución de los errores y homogeneidad de varianzas.

### **2.1.10- Selección de un genotipo para tratamientos mutagénicos**

Se seleccionó un genotipo de INTA destacado por su comportamiento *in vitro*, teniendo en cuenta los parámetros medidos en cada etapa de cultivo. Este genotipo fue utilizado en los posteriores ensayos de mutagénesis *in vitro*.

## **2.2- Inducción de mutaciones en cultivo *in vitro***

### **2.2.1- Elección del agente mutagénico**

El mutágeno a utilizar se escogió teniendo en cuenta la bibliografía consultada y el equipamiento disponible en el lugar de trabajo. En caña de azúcar se utilizan frecuentemente mutágenos físicos, principalmente radiación  $\gamma$ . Sin embargo, los mutágenos químicos conducen a mutaciones más específicas y predecibles, son más fáciles de administrar, y no requieren equipo especializado y costoso.

En este trabajo se utilizó el mutágeno químico etil metanosulfonato (EMS) (*Pubchem database*, SID: 24896575, CID: 6113), el cual produce mutaciones de punto del tipo transición G:C a A:T. El EMS es un agente mutagénico que causa una alta frecuencia de mutaciones en sitios al azar con una baja frecuencia de aberraciones cromosómicas. El manejo, almacenamiento y descarte del mutágeno se realizó con las precauciones propuestas en *Pubchem database* (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **2.2.2- Tratamientos mutagénicos**

El experimento se realizó sobre callos embriogénicos de seis semanas del cultivar INTA CP 98-828 en medio MS3.

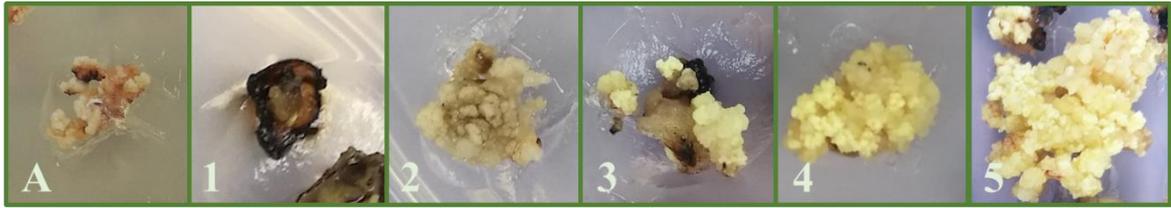
Se evaluaron cinco tratamientos: 0, 8, 16, 32 y 48 mM de EMS ( $C_3H_8O_3S$ ; 9,7 M; Sigma-Aldrich). Las soluciones de EMS se prepararon en medio de inducción MS3 líquido y estéril. La presencia de 2,4-D en el medio de cultivo se mantuvo, ya que durante la exposición

contribuye a la supervivencia celular y a mantener la cantidad de embriones presentes dentro de los callos (Munsamy et al., 2013).

Los tratamientos mutagénicos se llevaron a cabo de acuerdo a un protocolo diseñado en base al descrito por Sadat y Hoveize (2012) y teniendo en cuenta las recomendaciones de trabajo con mutágenos químicos de Suprasanna et al. (2012). Para cada dosis se sumergieron los callos en la solución de EMS y se incubaron en agitador orbital (100 rpm) durante 3 h. Luego de la incubación, los callos fueron colocados sobre papel de filtro estéril, dejando absorber el líquido durante unos minutos. Posteriormente, los callos fueron lavados tres veces con medio líquido MS3 libre de mutágeno con agitación constante. El primer lavado fue de 30 min, el segundo lavado de una hora y el tercer lavado se realizó durante 16 h para eliminar completamente el mutágeno del material. Finalmente, los callos fueron transferidos dos veces a papel de filtro para eliminar el exceso de líquido, dejando reposar 30 min en cámara de flujo laminar. Los callos tratados fueron sembrados en medio fresco en cajas de Petri, para su recuperación y proliferación durante ocho semanas, con subcultivos semanales a medio fresco, siguiendo el protocolo MS3/MS1 para la inducción de embriones somáticos.

El ensayo se realizó con un diseño completamente aleatorizado con 20 repeticiones para cada tratamiento ( $n = 100$ ). La unidad experimental estuvo representada por la caja de Petri con 15 callos.

La **capacidad de recuperación (RCmut)** fue registrada como el [número de callos con respuesta embriogénica/número total de callos tratados]  $\times 100$ . Para analizar el efecto del mutágeno sobre la masa del callo y su porción embriogénica se estableció la variable **sensibilidad de los callos (Smut)** basada en la escala de Santana (1982), utilizada para evaluar el desarrollo de callos de caña de azúcar. La escala se diseñó con cinco niveles de clasificación visual (Figura 2.2): 1 - callo muerto; 2 - callo vivo sin embriones somáticos; 3 - callo vivo con pequeños puntos de crecimiento de embriones; 4 - callo que crece en el 50% de su volumen con embriones somáticos; y 5 - callo con crecimiento normal (mayor al 50% de su volumen) y porcentaje de callo embriogénico normal. La puntuación por unidad experimental se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $(a \times 1 + b \times 2 + c \times 3 + d \times 4 + e \times 5) / \text{total de callos}$ , donde los valores  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  y  $e$  corresponden al número de callos con puntuación 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente.



**Figura 2.2:** Sensibilidad de callos al mutágeno. A: Callo tratado antes del periodo de recuperación; fotos 1 a 5: los diferentes niveles de sensibilidad de los callos.

### 2.2.3- Regeneración y aclimatación de plantas

Los callos recuperados fueron transferidos a medio MR bajo un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16 semanas para su regeneración.

Se mantuvo el diseño experimental establecido en los tratamientos mutagénicos. La unidad experimental estuvo representada por los frascos provenientes de una misma caja de Petri. Al finalizar las 16 semanas de regeneración se midieron los siguientes parámetros: **capacidad de regeneración (RGmut)** = número de plantas regeneradas/placa de Petri; **frecuencia de plantas albinas (FAmut)** = n° plantas albinas/n° total de plantas.

La aclimatación de las plantas tuvo lugar en bandejas como se describió anteriormente (Sección 2.1.7). Durante el trasplante se manifestó una aguda infección fúngica, a pesar de la aplicación de sulfato neutro de oxiquinoleina (0,5 g/L) como medida de control preventiva. Inmediatamente, se procedió al re-trasplante en sustrato estéril (Kekkilä) y perlita (6:1 v/v). Se perdió un gran número de plantas regeneradas y, la aclimatación y recuperación de las sobrevivientes llevó más de seis meses en invernáculo. Las plantas sobrevivientes fueron mantenidas en macetas de 1 L hasta su trasplante a campo, cuando las condiciones climáticas fueron las adecuadas para el desarrollo de la caña de azúcar.

Debido a esta situación, no pudo determinarse la **capacidad de aclimatación** de las plantas sometidas a los tratamientos mutagénicos. Con el fin de estimar un valor, se contaron las plantas sobrevivientes sobre el total de plantas recuperadas de la infección, a los ocho meses de aclimatación.

#### 2.2.4- Análisis estadístico

El análisis de datos se llevó a cabo en el marco teórico de GLM. Cada modelo se ajustó teniendo en cuenta la naturaleza de la variable respuesta, la distribución de los datos y la sobredispersión (Crawley, 2013). En el Cuadro 2.3 se muestran las variables analizadas, y la familia y función de enlace utilizadas para cada una. Los datos porcentuales de la variable RCmut se transformaron en frecuencias para el análisis. Las variables FAMut y ACmut no se sometieron a análisis estadístico, se calcularon medias para cada tratamiento.

Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba DGC (Di Rienzo et al., 2002) y los correspondientes contrastes de hipótesis, con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05.

Todos los análisis se llevaron a cabo con el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2017) en su interfaz con el software R versión 3.4.2 (The R-Foundation for Statistical Computing 2018).

**Cuadro 2.3:** Variables analizadas para estudiar el efecto de la dosis de EMS sobre la capacidad embriogénica y regeneración en el genotipo INTA CP 98-828.

<b>Variable respuesta</b>	<b>Familia</b>	<b>Función de enlace</b>
Capacidad de recuperación (RCmut)	Binomial	<i>logit</i>
Sensibilidad de callos (Smut)	Normal*	<i>identity</i>
Capacidad de regeneración (RGmut)	Binomial negativa	<i>log</i>
Frecuencia de plantas albinas (FAMut)	-	-
Capacidad de aclimatación (ACmut)	-	-

\*Para variables con distribución normal se probaron los supuestos de normalidad en la distribución de los errores y homogeneidad de varianzas.

#### 2.2.5- Estimación de la Dosis Letal Media (DL50)

La DL50 se define como la dosis de una sustancia que resulta en la reducción del 50% de los individuos expuestos respecto al control no tratado. En mutagénesis inducida, generalmente la DL50 es la dosis de mutágeno elegida como óptima para generar suficientes cambios genéticos sin comprometer la viabilidad de la planta. Con mutágenos químicos, a diferencia de

los físicos, no suele haber una correlación directa entre los efectos letales y los efectos mutagénicos (Prina et al., 2010). Por lo general, se recomienda trabajar con dosis menores a la DL50, como DL20 o DL30 para tejidos en cultivo *in vitro* (Suprasanna et al., 2012).

En este estudio, se estableció la DL50 de EMS para la **capacidad de regeneración** definida como la dosis de EMS que permite la regeneración de la mitad del número de plantas viables respecto al control (0 mM) y se evaluaron los efectos mutagénicos en los tratamientos donde la dosis de EMS  $\leq$  DL50. Por otro lado, se determinó la DL50 para la **capacidad de recuperación de los callos**, con el fin de evaluar si con la DL50 para la regeneración de plantas se recupera al menos el 50% de los callos con capacidad embriogénica.

La DL50 para la **capacidad de recuperación de callos** se calculó mediante el ajuste de un modelo de regresión logística, con función de enlace *logit* dada por la siguiente fórmula:

$$\log[\pi(x) / (1 - \pi(x))] = \alpha + \beta x$$

donde  $\pi$  es la probabilidad de recuperación de los callos,  $x$  la dosis de EMS, y  $\alpha$  y  $\beta$  son los parámetros de la regresión. La DL50 se definió como  $x$  cuando  $\pi = 0,5$  con su respectivo intervalo de confianza del 95%.

La DL50 para la **capacidad de regeneración** se calculó mediante el ajuste de tres modelos de regresión: Poisson, Binomial negativa y Lineal, siendo ésta última la de mejor ajuste de acuerdo al Criterio de Akaike (AIC). Se utilizó la función de enlace *identity* dada por la siguiente fórmula:

$$y(x) = \alpha + \beta x$$

donde  $y$  es el número de plantas regeneradas,  $x$  la dosis de EMS, y  $\alpha$  y  $\beta$  son los parámetros de la regresión. La DL50 se definió como  $x$  cuando  $y = 102$  plantas, con su respectivo intervalo de confianza del 95%.

## **2.3- Evaluación de la variabilidad generada por los tratamientos mutagénicos y el cultivo *in vitro***

El estudio se basó en la exploración preliminar de la variación fenotípica y genotípica en el material tratado, independientemente si esos cambios otorguen mejores atributos agronómicos al cultivo a corto plazo, enfocándose en la búsqueda de la dosis de mutágeno que genere suficientes cambios sin comprometer el desarrollo normal de las plantas.

Se evaluaron los efectos sobre la generación  $M_1V_1$  (primera generación vegetativa tratada con mutágeno) en los tratamientos 8, 16 y 32 mM de EMS ( $\leq$  DL50), y la generación  $S_1V_1$  (primera generación vegetativa de reproducción *in vitro*) en el tratamiento 0. Este último tratamiento pasó por el proceso de cultivo *in vitro* y probablemente sufrió cambios por variación somaclonal. Se incorporó como testigo el genotipo original o clon madre (WT, *wild type*) replicado en el mismo contexto experimental.

El tratamiento WT consistió en plántulas del cv. INTA 98-828 provenientes de yemas uninodales, mantenidas en macetas de 1 L con una mezcla 4:2:1 (v/v) de turba (Kekkilä), tierra estéril y perlita en condiciones de invernáculo, que luego fueron trasplantadas a campo junto a las plantas de los tratamientos mutagénicos. El uso de plántulas individuales permitió controlar la densidad de plantación en el ensayo a campo y mantener un estado de desarrollo similar a los plantas provenientes del cultivo *in vitro*.

### **2.3.1-Evaluaciones en condiciones de invernáculo**

Durante la etapa de invernáculo, las evaluaciones fueron cualitativas mediante la observación de cualquier cambio morfológico o fisiológico atribuible a un efecto mutagénico o de variación somaclonal.

### **2.3.2- Evaluaciones a campo**

Las plantas aclimatadas fueron trasplantadas a campo en octubre de 2019 en un lote experimental de la EEA Famaillá (latitud sur 27° 03' 15,1", longitud oeste 65° 25' 22,4" a 363 m sobre el nivel del mar). La zona agroecológica se caracteriza por clima subtropical con

régimen de precipitación monzónico. El promedio de precipitación anual es de 995 mm, con temperatura media mínima de 5,2°C en el mes de julio, y media máxima de 30,6°C en enero (Sopena, 2010).

Se trasplantaron 250 plántulas escogidas al azar, en un diseño experimental completamente aleatorizado con cinco tratamientos de 50 plantas cada uno. Cada planta fue dispuesta a 0,80 m en la línea de plantación y 1,60 m entre líneas. Este diseño permite maximizar la expresión fenotípica de los atributos agronómicos, ya que algunos caracteres importantes como el número de tallos se ven fuertemente influenciados por ajustes en la densidad de plantación y espaciamiento entre plantas (De Sousa-Vieira y Milligan, 1999). Todo el ensayo fue bordeado con clones del cv. INTA 98-828 para homogeneizar el efecto de competencia entre plantas.

Durante el primer mes después del trasplante fue necesario un riego semanal, debido a las escasas precipitaciones en octubre de 2019. A partir de allí, el ensayo fue conducido en seco. El control de malezas se realizó manualmente hasta el cierre del cañaveral.

La evaluación fenotípica se realizó en el año 2020, entre la segunda quincena de mayo y primera de junio, período reportado como el más adecuado para caracterizar la calidad de los materiales de selección y detectar diferencias importantes para la selección (Cuenya y Mariotti, 1992; citado por Sopena, 2010).

Se midieron los siguientes caracteres en campo, en los 50 genotipos de cada tratamiento:

❖ **Número de tallos (NT)** fue registrado por conteo en cada genotipo.

❖ **Longitud del tallo (LT)** expresado en centímetros, como el promedio de cinco tallos al azar por genotipo. Las mediciones se hicieron desde la base hasta la hoja +1, con una precisión de  $\pm 5$  cm.

❖ **Diámetro de tallo medio (DT)** expresado en milímetros, como el promedio de cinco tallos al azar por genotipo. Las mediciones fueron efectuadas con calibre digital en la porción media del tallo (séptimo entrenudo contando desde la base), con una precisión de  $\pm 0,03$  mm.

❖ **Longitud del entrenudo medio (LE)** expresado en centímetros, como el promedio de cinco tallos al azar por genotipo. Las mediciones se hicieron en el séptimo entrenudo contando desde la base, con una precisión de  $\pm 0,5$  cm.

❖ **Hoja:** Se observó la presencia de alteraciones en la coloración de la lámina y vaina, y cualquier otro tipo de variación.

❖ **Enfermedades:** Se observó mensualmente la presencia de síntomas de las principales enfermedades que afectan al cultivo.

En junio de 2020, se recogieron a campo muestras constituidas por siete tallos de 25 genotipos al azar por tratamiento. Las muestras fueron completamente deshojadas y despuntadas en el punto natural de quiebre del tallo y procesadas dentro de las 48 h de recolectadas.

Se midieron los siguientes caracteres después de la cosecha:

❖ **Peso fresco de tallo individual (PT)** expresado en kg, como el promedio de siete tallos por genotipo. Se pesó en balanza con una precisión de  $\pm 1$  g.

❖ **Número total de entrenudos (NE)** Se cuantificó a partir de cinco tallos recolectados y expresado en promedio.

❖ **Yemas:** Se observó la forma de la yema, presencia de yemas gemelas y tallos bifurcados, yemas adventicias o ausencia de yemas (caña ciega).

Para determinar los caracteres de calidad fabril ( $^{\circ}\text{Bx}$ , Pol%ca y RFE%), la molienda se efectuó en un trapiche experimental de un solo molino, instalado en la EEA Famaillá. La presión de trabajo se mantuvo constante a  $150 \text{ kg/cm}^2$  y una extracción aproximada de jugos, en una sola prensada, del 45%.

❖ **Contenido de sólidos solubles en jugo ( $^{\circ}\text{Bx}$ )**, expresado en grados brix, con un refractómetro automático (Smart-1, ATAGO Co. LTD; Japón).

❖ **Pol por ciento en caña (concentración de sacarosa en caña) (Pol%ca)** expresado en porcentaje. Pol%ca se calculó mediante el producto de Pol%jugo y el factor de Java de 0,81. El Pol%jugo (concentración de sacarosa en jugo) se determinó mediante lectura polarimétrica con un polarímetro automático (Polatronic NCE; Alemania), realizada luego de clarificar el jugo con subacetato de plomo y filtrar.

❖ **Rendimiento Fabril Estimado (RFE%)** expresado en porcentaje, calculado según la fórmula:  $RFE\% = (1,4-40/Pol\%jugo) \times Pureza \times 0,657$ , donde la Pureza =  $Pol\%jugo/^\circ Bx \times 96$ .

Así también, en todo momento se registró cualquier otro tipo de cambio visible en las plantas, morfológico o fisiológico, que pueda atribuirse al tratamiento como efecto mutagénico o de variación somaclonal.

### 2.3.3- Estimación de los parámetros fenotípicos y genotípicos

Las varianzas intra e inter-tratamiento,  $\sigma_w^2$  y  $\sigma_b^2$  respectivamente, se estimaron a partir del análisis de la varianza (ANOVA) y el cálculo de las esperanzas de los cuadrados medios (ECM), como se indica a continuación, a través de un modelo lineal:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}.$$

donde  $y_{ij}$  representa la observación del j genotipo en el i tratamiento,  $\mu$  es la media general,  $\tau_i$  representa el efecto del tratamiento y  $\varepsilon_{ij}$  corresponde al error experimental.

Causa de la variación	Grados de libertad	ECM
Entre los tratamientos	$n-1$	$CM = \sigma_w^2 + k \sigma_b^2$
Entre genotipos dentro de los tratamientos	$n(k-1)$	$CM = \sigma_w^2$

donde  $n$  es el número de tratamientos y  $k$  el número de genotipos dentro de cada tratamiento.

Los ANOVA se realizaron para cada variable estudiada sobre los cuatro tratamientos sin incluir el testigo WT. Por otro lado, se repitieron los ANOVA incluyendo el testigo para comparar las medias mediante la prueba DGC (Di Rienzo et al., 2002), con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05.

Para una exploración preliminar de la variabilidad genética generada en las poblaciones obtenidas en cada tratamiento, se estimó el **Grado de Determinación Genético (GDG)** para cada atributo medido, que relaciona las magnitudes relativas de los componentes genéticos y ambientales que afectan la variabilidad de la expresión de un carácter:

$$\text{GDG} = V_G/V_P = (V_P - V_E)/V_P$$

donde  $V_G$  es la varianza genética,  $V_P$  la varianza fenotípica y  $V_E$  la varianza ambiental. Dado que  $V_P = V_G + V_E$ .

Los valores de  $V_G$ ,  $V_E$  y  $V_P$  se calcularon como describen Mariotti y Collavino (1991, 2014) para el caso de una población con una sola repetición por genotipo. La varianza se puede interpretar solo en términos de la  $V_P$  y se requiere, en consecuencia, un estimador independiente (testigo) de la varianza ambiental ( $V_E$ ) a la que están sometidos los integrantes de la población investigada. En materiales reproducidos *in vitro* se debe utilizar como testigo el mismo clon madre replicado en el mismo contexto experimental en que se expresa la población en estudio (Mariotti, 1991), en este trabajo denominado WT.

La  $V_E$  se corrigió según la siguiente expresión (Mariotti, 1991), para referirla a la media poblacional que corresponda:

$$V_{Ei \text{ corregida}} = V_E (m_{wt} / m_{ti})^2$$

donde  $V_E$  es la varianza ambiental estimada por el testigo,  $m_{wt}$  es la media poblacional del testigo y  $m_{ti}$  la media poblacional del tratamiento  $i$ .

Además, se calcularon los **Coefficientes de variabilidad  $CV_P$  y  $CV_G$** , que relacionan las raíces cuadradas de las varianzas fenotípicas y genotípicas, respectivamente, para cada atributo con sus respectivas medias poblacionales, expresados en porcentaje.

Se confeccionaron gráficos Box-Plot con el fin de visualizar la variabilidad fenotípica, la expresión media fenotípica y genotipos con valores extremos para cada carácter.

El análisis de datos se llevó a cabo con el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2017).

## RESULTADOS

### 3.1- Respuesta diferencial de los genotipos de caña de azúcar de INTA a la embriogénesis somática

#### 3.1.1- Capacidad de establecimiento de los explantes

El análisis de la varianza por GLM evidenció la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) entre los genotipos para la capacidad de establecimiento de los explantes en cultivo *in vitro*.

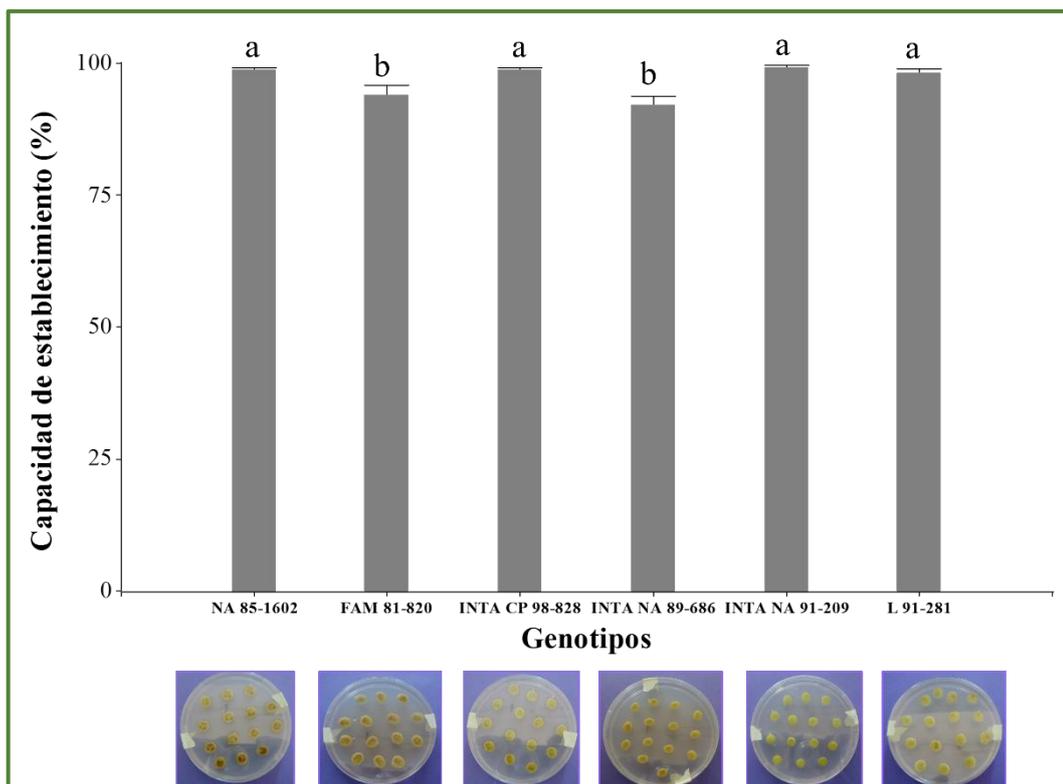
Todos los genotipos evaluados presentaron alta capacidad de establecimiento, superior al 90% (Figura 3.1). Sin embargo, INTA NA 89-686 y FAM 81-820 mostraron ES significativamente menor respecto a los demás genotipos de INTA y al material de referencia NA 85-1602 (Cuadro 3.1).

En los primeros días de establecimiento, se observó oxidación de los explantes en la mayoría de los cultivares, con niveles más altos en INTA NA 89-686 y NA 85-1602, sin embargo, la oxidación se disipó durante la proliferación de callos, sin efectos nocivos para el cultivo.

**Cuadro 3.1:** Medias  $\pm$  errores estándar para la capacidad de establecimiento.

Genotipo	Capacidad de establecimiento (%)
NA 85-1602	99,13 $\pm$ 0,60 a
FAM 81-820	94,31 $\pm$ 2,04 b
INTA CP 98-828	99,13 $\pm$ 0,60 a
INTA NA 89-686	92,56 $\pm$ 1,75 b
INTA NA 91-209	99,56 $\pm$ 0,44 a
L 91-281	98,69 $\pm$ 0,71 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )

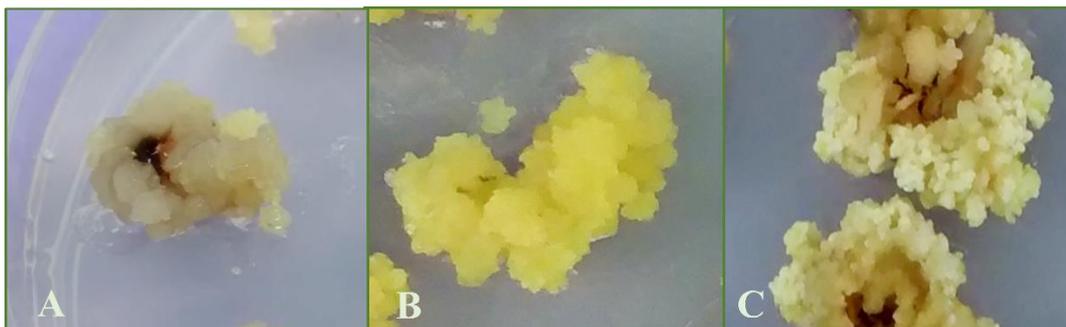


**Figura 3.1:** Capacidad de establecimiento para los genotipos de caña de azúcar de INTA evaluados en su respuesta al cultivo *in vitro*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos ( $\alpha = 0.05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.1.2- Porcentaje de callo embriogénico

Los cinco genotipos de INTA estudiados fueron capaces de formar diferentes tipos callos en medio suplementado con 2,4-D. El desarrollo de callo comenzó aproximadamente siete días después del establecimiento de los explantes y se manifestó por la hinchazón de los tejidos acompañado de una leve oxidación.

Luego de ocho semanas se observaron tres tipos de callo en los genotipos estudiados: callos semitranslúcidos, no embriogénicos, de apariencia húmeda y mucilaginosa (Figura 3.2A), callos no embriogénicos, friables y amarillentos (Figura 3.2B) y los callos embriogénicos compactos, blancos y con ondulaciones (embriones somáticos) denominados de Tipo 3 por Taylor et al. (1992) (Figura 3.2C).



**Figura 3.2:** Tipos de callos observados durante el cultivo *in vitro*. A- Callo mucilaginoso, B- callo friable y amarillento y C- callo embriogénico o de Tipo 3.

El desarrollo del callo embriogénico comenzó dentro de las primeras dos semanas de cultivo con la proliferación celular sobre la superficie del explante, provocando la desorganización del tejido foliar y la formación de un callo mucilaginoso. A partir de la tercera semana se observó la proliferación de pequeñas masas blanquecinas y compactas originadas sobre el callo mucilaginoso. Finalmente, a las ocho semanas de cultivo los embriones somáticos se desarrollaron no solo sobre la superficie del callo, sino en todo su volumen.

La proporción de los diferentes tipos de callo en la masa callosa estuvo influenciada por el genotipo y las condiciones de cultivo. El análisis de GLM para la variable PT3 mostró una interacción significativa ( $P < 0,0001$ ) entre el genotipo y el protocolo de inducción.

Los resultados del análisis de PT3 se encuentran en el Cuadro 3.2 e ilustrados en la Figura 3.3. Solo el cultivar INTA CP 98-828 se comportó estadísticamente igual al genotipo de referencia con ambos protocolos de inducción de callos, MS3 y MS3/MS1. INTA CP 98-828 mostró un PT3 superior al 75%.

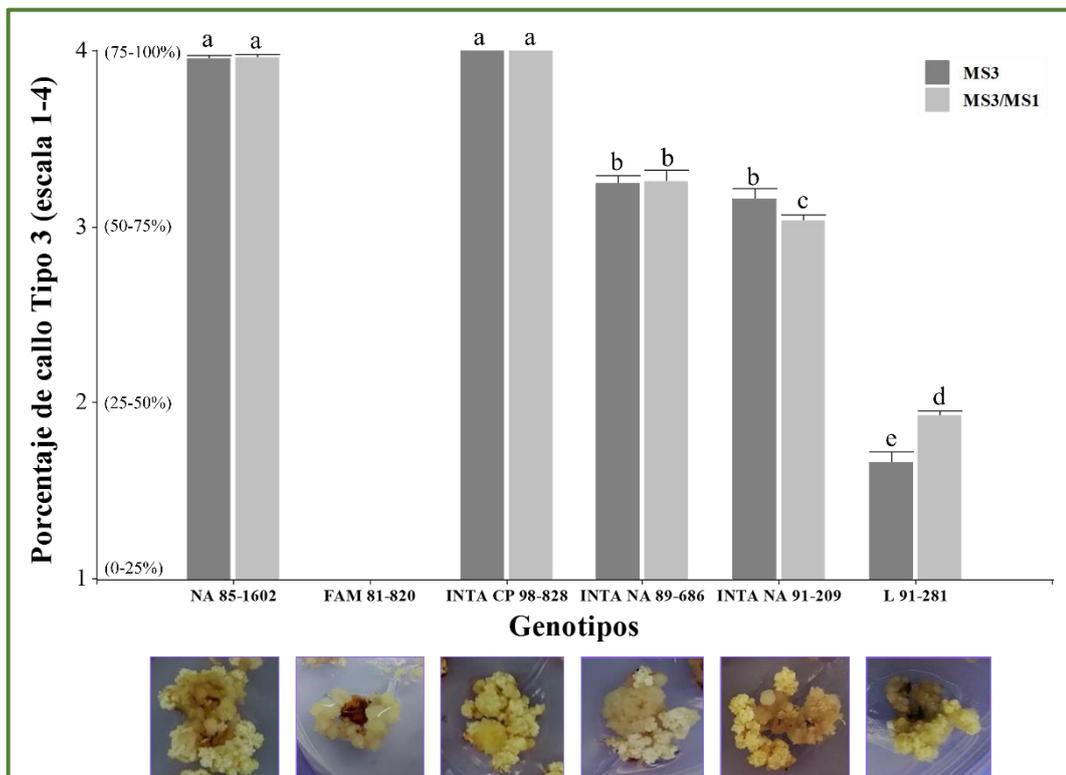
Por otro lado, los genotipos INTA NA 89-686 e INTA NA 91-209 también presentaron valores altos de PT3 con ambos protocolos, superiores al 50% de callo embriogénico sobre el volumen total. El genotipo L 91-281 presentó valores de PT3 menores a los demás genotipos estudiados, sin embargo, con el protocolo MS3/MS1 fueron cercanos al 50%. La porción de callo restante fue principalmente del tipo friable y amarillento en estos cultivares.

Los callos derivados del cultivar FAM 81-820 fueron del tipo semitranslúcidos y mucilaginosos, sin presencia de embriones somáticos.

**Cuadro 3.2:** Medias  $\pm$  errores estándar para el porcentaje de callo Tipo 3.

Genotipo	Protocolo	Porcentaje de callo Tipo 3*
NA 85-1602	MS3	3,96 $\pm$ 0,04 a
FAM 81-820		0,00 $\pm$ 0,00
INTA CP 98-828		4,00 $\pm$ 0,04 a
INTA NA 89-686		3,25 $\pm$ 0,04 b
INTA NA 91-209		3,16 $\pm$ 0,04 b
L 91-281		1,66 $\pm$ 0,04 e
NA 85-1602	MS3/MS1	3,96 $\pm$ 0,04 a
FAM 81-820		0,00 $\pm$ 0,00
INTA CP 98-828		4,00 $\pm$ 0,04 a
INTA NA 89-686		3,26 $\pm$ 0,04 b
INTA NA 91-209		3,03 $\pm$ 0,04 c
L 91-281		1,93 $\pm$ 0,04 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )  
 \*Medido en escala visual 1 = 0-25%; 2 = 25-50%; 3 = 50-75% y 4 = 75-100% y promediado.



**Figura 3.3:** Porcentaje de callo Tipo 3 para los genotipos de caña de azúcar de INTA evaluados en su respuesta al cultivo *in vitro*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos ( $\alpha = 0,05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.1.3- Capacidad embriogénica de los genotipos

La capacidad embriogénica, definida como el  $[\text{n}^\circ \text{ de callos con respuesta embriogénica} / \text{n}^\circ \text{ total de callos}] \times 100$ , fue muy variable (0-100%) en los genotipos en estudio. De los cinco cultivares de INTA evaluados, cuatro mostraron capacidad embriogénica (Figura 3.4): INTA CP 98-828, INTA NA 89-686, INTA NA 91-209 y L 91-281, con un mínimo de 15%, un máximo de 100% y una media general de 79,23%.

El análisis estadístico demostró una interacción genotipo  $\times$  protocolo estadísticamente significativa ( $P = 0.0252$ ) en esta variable. Las mejores combinaciones de genotipo/protocolo fueron INTA CP 98-828 con MS3/MS1 e INTA NA 89-686 con MS3 y MS3/MS1, que se comportaron como el material de referencia NA 85-1602, mostrando EM superior al 90%. Además, INTA CP 98-828 (MS3) e INTA NA 91-209 (MS3 y MS3/MS1) también presentaron capacidad embriogénica alta ( $>75\%$ ) y L91-281 intermedia con ambos protocolos ( $\sim 50\%$ ). Como se señaló anteriormente, FAM 81-820 no formó ningún callo embriogénico (Cuadro 3.3).

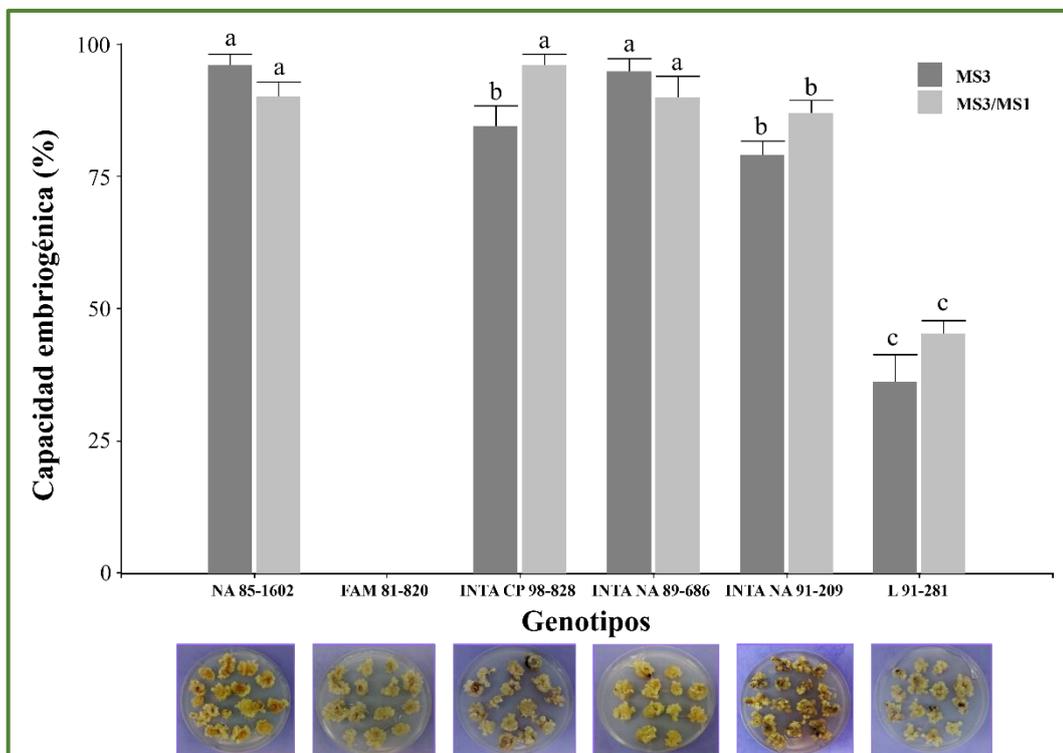
**Cuadro 3.3:** Medias  $\pm$  errores estándar para la capacidad embriogénica.

<b>Genotipo</b>	<b>Protocolo</b>	<b>Capacidad embriogénica (%)</b>
NA 85-1602		96,00 $\pm$ 2,08 a
FAM 81-820		0,00 $\pm$ 0,00
INTA CP 98-828	MS3	84,50 $\pm$ 3,97 b
INTA NA 89-686		94,83 $\pm$ 2,37 a
INTA NA 91-209		79,13 $\pm$ 2,62 b
L 91-281		36,00 $\pm$ 5,29 c
NA 85-1602		90,00 $\pm$ 2,90 a
FAM 81-820		0,00 $\pm$ 0,00
INTA CP 98-828	MS3/MS1	96,00 $\pm$ 2,06 a
INTA NA 89-686		89,75 $\pm$ 4,26 a
INTA NA 91-209		86,88 $\pm$ 2,62 b
L 91-281		45,25 $\pm$ 2,43 c
NA 85-1602		90,00 $\pm$ 2,90 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )

Por otro lado, si bien los cultivares variaron en su capacidad embriogénica y porcentaje de callo Tipo 3 con el protocolo MS3/MS1, se observó bajo la lupa (40X) una mejor maduración

general de los embriones somáticos en todos los genotipos. Esto se puso de manifiesto en la forma más definida de los embriones respecto a los desarrollados con el protocolo MS3.



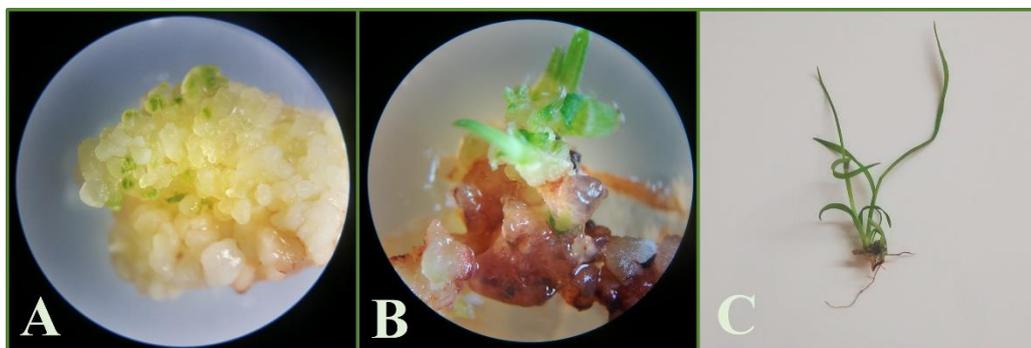
**Figura 3.4:** Capacidad embriónica para los genotipos de caña de azúcar de INTA evaluados en su respuesta al cultivo *in vitro*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos ( $\alpha = 0.05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.1.4- Capacidad de regeneración de los callos

La regeneración de plántulas se produjo solo a partir de los callos embriogénicos. Observaciones bajo la lupa binocular (4X) mostraron que el proceso de regeneración de plantas sucedió a partir de los embriones somáticos como se muestra en la Figura 3.5A. La aparición de brotes y raíces comenzó simultáneamente en los sectores embriogénicos, y el resto del callo sufrió oxidación y desecamiento del tejido hasta desprenderse de la plántula (Figura 3.5B y C)

La germinación de embriones somáticos se indujo con luz en el medio de regeneración MR, en ausencia de hormonas vegetales para la inducción de brotes, pero suplementado con

AIB para inducir el enraizamiento. Después de 8-12 semanas, se observaron plántulas bien desarrolladas en MR.



**Figura 3.5:** Callo embriogénico durante en el proceso de regeneración. A- Se observa el comienzo de la regeneración a partir de los embriones somáticos; B- desarrollo de brotes solo en la porción embriogénica del callo; C- Brotes y raíces en una plántula de cuatro semanas de desarrollo.

El análisis GLM del número de plantas regeneradas por placa de Petri (unidad experimental) manifestó una diferencia altamente significativa entre genotipos ( $P < 0,0001$ ) y no se observó un efecto del protocolo ni de la interacción entre los factores ( $P > 0,05$ ).

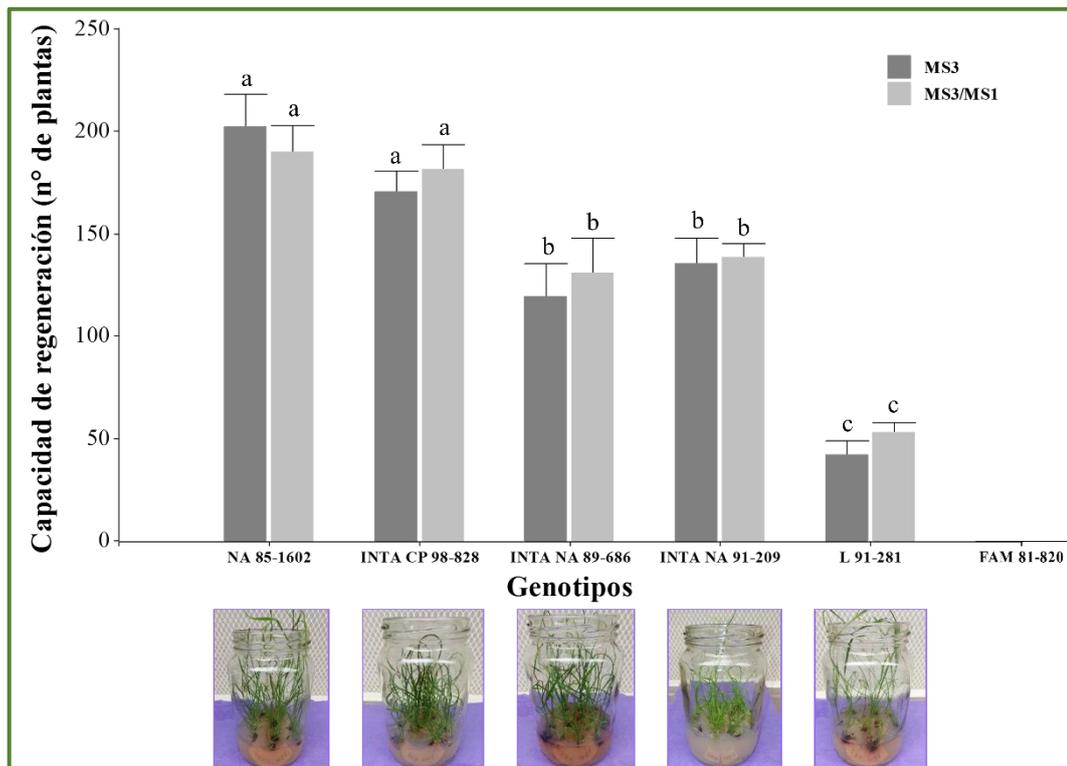
Como se observa en el Cuadro 3.4 y en la Figura 3.6, los callos del genotipo INTA CP 98-828 se destacaron en su capacidad de regeneración, con una media de 181 y 171 plantas/placa regeneradas siguiendo los protocolos MS3/MS1 y MS3 respectivamente. Este genotipo resultó estadísticamente igual a NA 85-1602 (202 y 190 plantas/placa con MS3 y MS3/MS1). El genotipo L 91-281 presentó la menor capacidad de regeneración, dando 42 y 53 plantas/placa para callos provenientes de MS3 y MS3/MS1 respectivamente. Los demás genotipos, INTA NA 89-686 e INTA NA 91-209, presentaron regeneración significativamente menor al genotipo de referencia, pero superiores a 100 plantas/placa.

Ninguno de los genotipos estudiados desarrolló plantas con algún grado de albinismo u otra anomalía morfológica distinguible.

**Cuadro 3.4:** Medias  $\pm$  errores estándar para la capacidad de regeneración.

Genotipo	Protocolo	Capacidad de regeneración (n° de plantas/placa)
NA 85-1602	MS3	202,50 $\pm$ 15,87 a
FAM 81-820		00,00 $\pm$ 00,00
INTA CP 98-828		170,86 $\pm$ 9,88 a
INTA NA 89-686		119,20 $\pm$ 16,27 b
INTA NA 91-209		135,50 $\pm$ 12,36 b
L 91-281		41,88 $\pm$ 6,72 c
NA 85-1602	MS3/MS1	190,00 $\pm$ 12,59 a
FAM 81-820		00,00 $\pm$ 00,00
INTA CP 98-828		181,43 $\pm$ 12,12 a
INTA NA 89-686		130,71 $\pm$ 17,31 b
INTA NA 91-209		138,43 $\pm$ 6,99 b
L 91-281		53,00 $\pm$ 4,51 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )



**Figura 3.6:** Capacidad de regeneración para los genotipos de caña de azúcar de INTA evaluados en su respuesta al cultivo *in vitro*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos ( $\alpha = 0.05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.1.5- Análisis de correlación entre la capacidad de establecimiento, la capacidad de regeneración, capacidad embriogénica y Porcentaje de callo Tipo 3

Los datos se analizaron utilizando los coeficientes de Spearman (Cuadro 3.5). Se observó una correlación positiva significativa entre la capacidad de regeneración y el porcentaje de callo embriogénico ( $r = 0,77$ ;  $P < 0,0001$ ), entre la capacidad de regeneración y la capacidad embriogénica ( $r = 0,79$ ;  $P < 0,0001$ ), y a su vez el porcentaje de callo embriogénico y la capacidad embriogénica ( $r = 0,59$ ;  $P < 0,0001$ ). Por otro lado, no se observó correlación significativa entre la capacidad de establecimiento y las demás variables ( $P > 0,05$ ).

**Cuadro 3.5:** Coeficientes de correlación de Spearman entre ES, EM, PT3 y RG.

Variable	ES	EM	RG	PT3
ES	1			
EM	0,06	1		
RG	0,02	0,79*	1	
PT3	0,01	0,59*	0,77*	1

\* Correlación significativa ( $P < 0,05$ )

### 3.1.6- Capacidad de aclimatación en condiciones de invernáculo

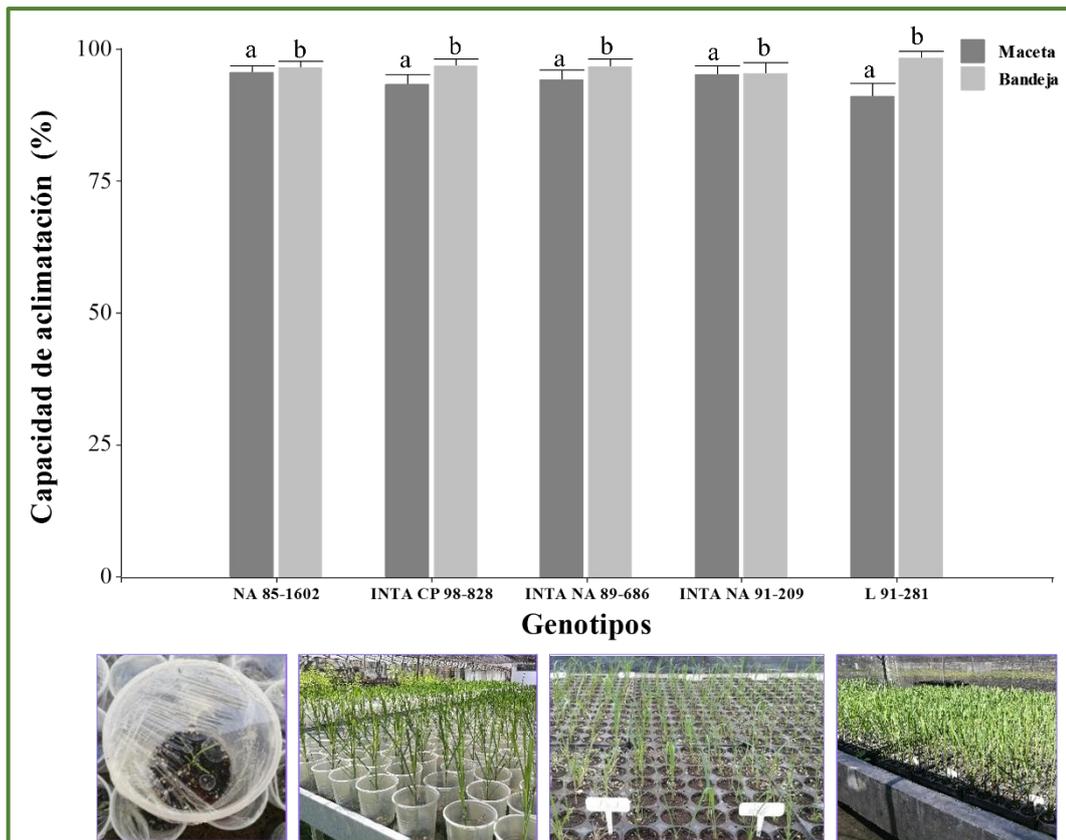
La capacidad de aclimatación de las plantas regeneradas solo dependió del procedimiento de aclimatación efectuado (bandeja o maceta) ( $P = 0,0145$ ), y no se vio afectada por el protocolo de inducción de callo, el genotipo evaluado, ni las interacciones entre los factores ( $P > 0,05$ ).

Para todos los cultivares, el procedimiento de aclimatación en bandeja fue significativamente más eficiente que en maceta (Figura 3.6), aunque debe destacarse que ambos procedimientos tuvieron alta capacidad de aclimatación, superior a 90% para todos los genotipos (Cuadro 3.6). La media general de la aclimatación en bandeja fue 96,80%, mientras que en maceta fue ligeramente inferior con 93,91% de las plantas aclimatadas. En las plantas aclimatadas en macetas se observó un mayor desarrollo en longitud de las hojas, mientras que la aclimatación en bandejas favoreció el crecimiento del tallo, tanto en altura como en grosor.

**Cuadro 3.6:** Medias  $\pm$  errores estándar para la capacidad de aclimatación.

Genotipo	Protocolo	Capacidad de aclimatación (%)
NA 85-1602	Maceta	95,73 $\pm$ 1,07 a
INTA CP 98-828		93,43 $\pm$ 1,74 a
INTA NA 89-686		94,25 $\pm$ 1,89 a
INTA NA 91-209		95,23 $\pm$ 1,62 a
L 91-281		91,13 $\pm$ 2,48 a
NA 85-1602	Bandeja	96,47 $\pm$ 1,34 b
INTA CP 98-828		96,86 $\pm$ 1,38 b
INTA NA 89-686		96,67 $\pm$ 1,42 b
INTA NA 91-209		95,38 $\pm$ 2,20 b
L 91-281		98,40 $\pm$ 1,09 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )



**Figura 3.7:** Capacidad de aclimatación para los genotipos de caña de azúcar de INTA evaluados en su respuesta al cultivo *in vitro*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos ( $\alpha = 0,05$ ). Medias y errores estándar.

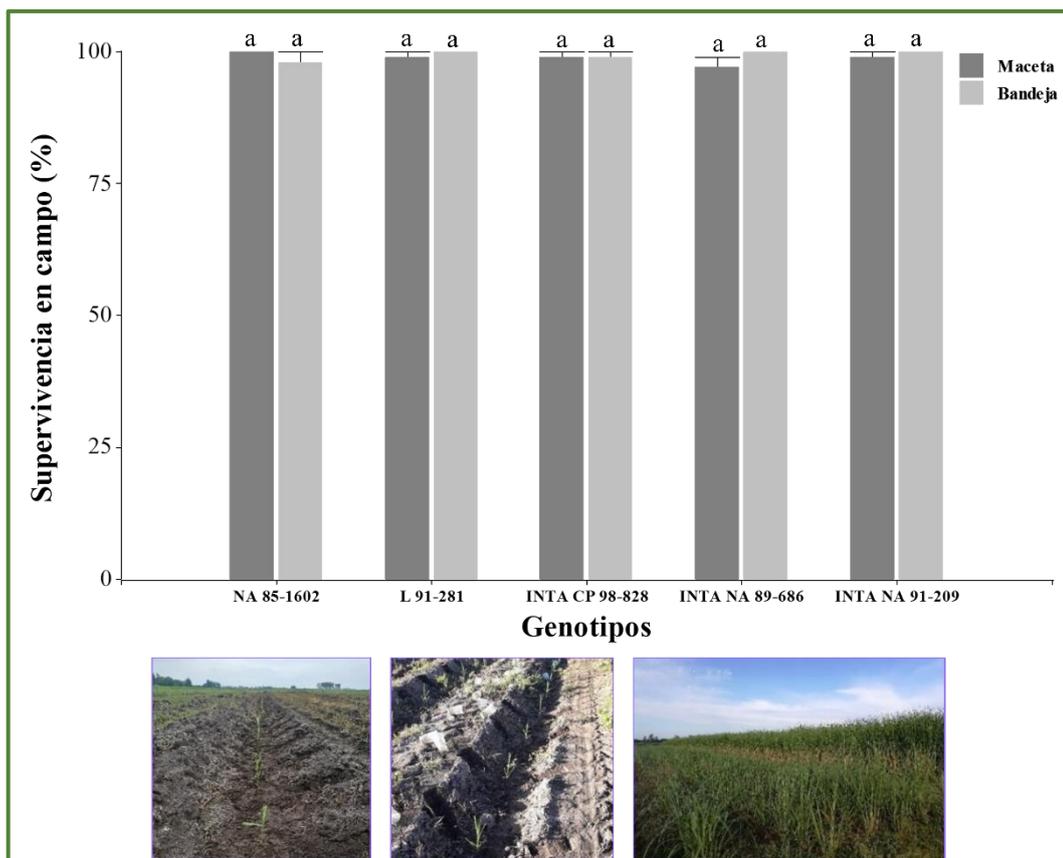
### 3.1.7- Supervivencia de las plantas en el campo

La supervivencia en el campo se evaluó sobre un total de 1000 plantas, 100 por genotipo y procedimiento de aclimatación. No se observaron diferencias significativas entre los genotipos ( $P = 0,8140$ ), procedimientos ( $P = 0,3101$ ) y la interacción entre ambos factores ( $P = 0,0677$ ). Todos los genotipos presentaron una supervivencia de plantas establecidas en campo superior al 98% (Cuadro 3.7 y Figura 3.8).

**Cuadro 3.7:** Medias  $\pm$  errores estándar para la supervivencia en el campo.

Genotipo	Protocolo	Supervivencia en el campo (%)
NA 85-1602	Maceta	100,00 $\pm$ 0,00 a
INTA CP 98-828		99,00 $\pm$ 1,00 a
INTA NA 89-686		97,00 $\pm$ 2,00 a
INTA NA 91-209		99,00 $\pm$ 1,00 a
L 91-281		99,00 $\pm$ 1,00 a
NA 85-1602	Bandeja	98,00 $\pm$ 2,00 a
INTA CP 98-828		99,00 $\pm$ 1,00 a
INTA NA 89-686		100,00 $\pm$ 0,00 a
INTA NA 91-209		100,00 $\pm$ 0,00 a
L 91-281		100,00 $\pm$ 0,00 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )



**Figura 3.8:** Supervivencia en el campo de los genotipos de caña de azúcar de INTA evaluados en su respuesta al cultivo *in vitro*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos ( $\alpha = 0.05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.1.8- Selección del genotipo con mejor respuesta a la embriogénesis somática y al cultivo *in vitro*

Los cultivares INTA CP 98-828, INTA NA 89-686, INTA NA 91-209 y L 91-281 mostraron capacidad para producir embriones somáticos y regenerar plantas completas, las cuales tuvieron buena adaptación en invernáculo y posteriormente en campo.

Los resultados demostraron que el genotipo INTA CP 98-828 se destaca por su respuesta *in vitro* en todas las etapas de cultivo, según las variables analizadas y respecto al material de referencia elegido en este trabajo. Para ese genotipo, el protocolo MS3/MS1 resultó ser el más conveniente para la inducción de callos embriogénicos y su regeneración, y la aclimatación en

bandeja resultó ser la más eficiente. INTA CP 98-828 se seleccionó para los posteriores estudios de mutagénesis *in vitro*.

### 3.2- Mutagénesis *in vitro* en el genotipo INTA CP 98-828

#### 3.2.1- Efecto de la dosis de EMS sobre la capacidad embriogénica

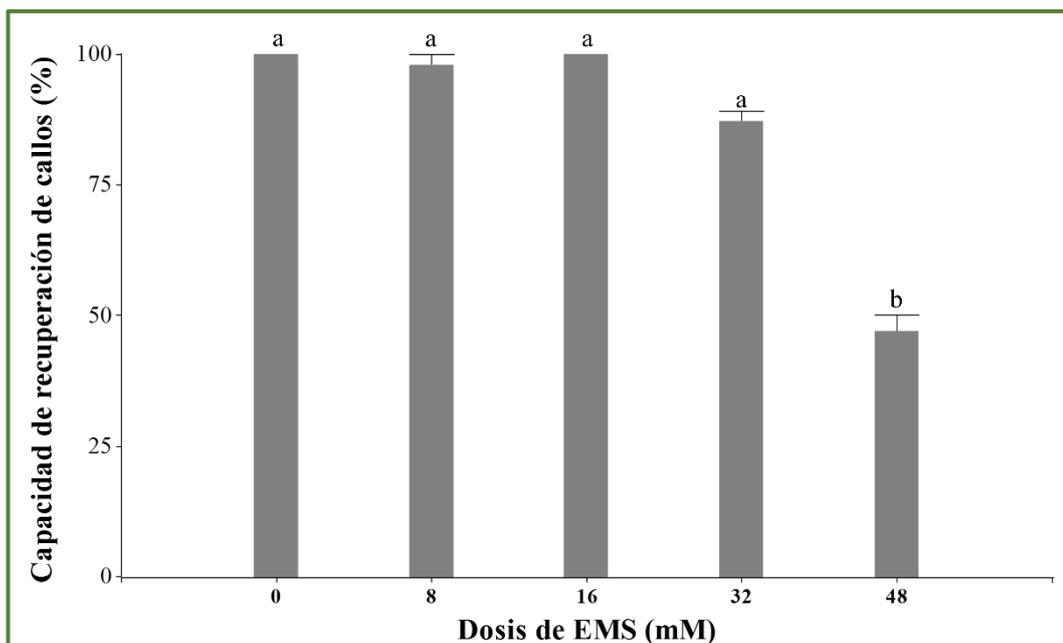
Para estudiar cómo afecta la dosis del agente mutagénico EMS sobre la capacidad embriogénica de los callos, se definió la variable capacidad de recuperación de callos (RCmut) como el número de callos con respuesta embriogénica recuperados/total de callos tratados, expresado en porcentaje.

Según el análisis de la varianza por GLM, la dosis de mutágeno aplicada tuvo un efecto significativo sobre RCmut ( $P < 0,0001$ ) luego de ocho semanas de recuperación y proliferación de los callos. Sin embargo, como se observa en la Figura 3.9, la capacidad de recuperación solo se vio significativamente afectada en la dosis de 48 mM de EMS. En esta dosis de mutágeno se observó una reducción de más del 50% de callos con capacidad embriogénica (Cuadro 3.8). Las demás dosis no presentaron un efecto significativo sobre la recuperación con respecto al tratamiento 0 mM.

**Cuadro 3.8:** Medias  $\pm$  errores estándar para la capacidad de recuperación de callos del genotipo INTA CP 98-828 en los diferentes tratamientos mutagénicos.

Dosis de EMS	Capacidad de recuperación (%)
0 mM	100,00 $\pm$ 0,00 a
8 mM	98,00 $\pm$ 2,00 a
16 mM	100,00 $\pm$ 0,00 a
32 mM	87,23 $\pm$ 1,93 a
48 mM	47,06 $\pm$ 3,10 b

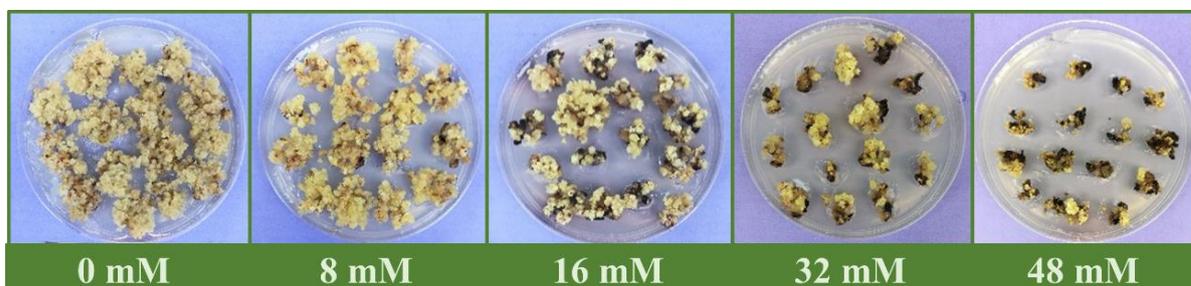
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )



**Figura 3.9:** Capacidad de recuperación de los callos del genotipo INTA CP 98-828 en función de la dosis de EMS aplicada. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.2.2- Efecto de la dosis de EMS sobre la proliferación del callo embriogénico

Si bien la dosis de EMS aplicada a los callos del genotipo INTA CP 98-828 no afectó en gran medida la capacidad embriogénica, exceptuando la dosis más alta (48 mM), tuvo un efecto más evidente sobre la proliferación del callo (Figura 3.10).



**Figura 3.10:** Efecto de la dosis de EMS sobre la proliferación del callo embriogénico en el genotipo INTA CP 98-828.

Para evaluar estadísticamente este efecto en el crecimiento del callo, y más específicamente sobre la porción embriogénica, se diseñó una escala visual<sup>2</sup> basada en la escala de Santana (1982) y se denominó a la variable “sensibilidad de los callos” (Smut).

El análisis estadístico mostró un efecto significativo ( $P < 0,0001$ ) de la dosis de EMS sobre Smut (Cuadro 3.9).

Como se observa en la Figura 3.11, los tratamientos de 0 mM y 8 mM de EMS no presentaron diferencias significativas y desarrollaron callos con crecimiento normal que duplicaron el volumen inicial tratado y presentaron un porcentaje de callo embriogénico normal para el genotipo INTA CP 98-828 (grado 5 en la escala). Cabe señalar que la dosis de 8 mM presentó algunos callos con características de grado 1 (callos muertos) y de grado 4.

Los callos tratados con la dosis 16 mM se vieron afectados en la proliferación del callo, en su mayoría crecieron alrededor del 50% de su volumen y formaron normalmente embriones (grado 4 y 5). En este tratamiento no se observaron callos muertos, pero algunos se vieron afectados en el grado 3 de la escala.

La dosis 32 mM presentó principalmente callos vivos de aspecto húmedo y semitranslúcido que no proliferaron en volumen, con puntos de crecimiento embriogénico (grado 3). Este tratamiento presentó la mayor variación en la escala: callos muertos, callos vivos sin sectores embriogénicos, como así también callos que proliferaron en volumen con porcentaje de embriones normal.

La dosis 48 mM presentó el efecto más marcado, con mayor presencia de callos muertos, de aspecto húmedo y color marrón oscuro o negro (grado 1), y alta proporción de callos vivos de aspecto húmedo y semitranslúcido sin crecimiento en masa (grado 2). Sin embargo, en esta dosis también se evidenció la presencia de unos pocos callos con pequeños sectores embriogénicos (grado 3) capaces de regenerar plantas.

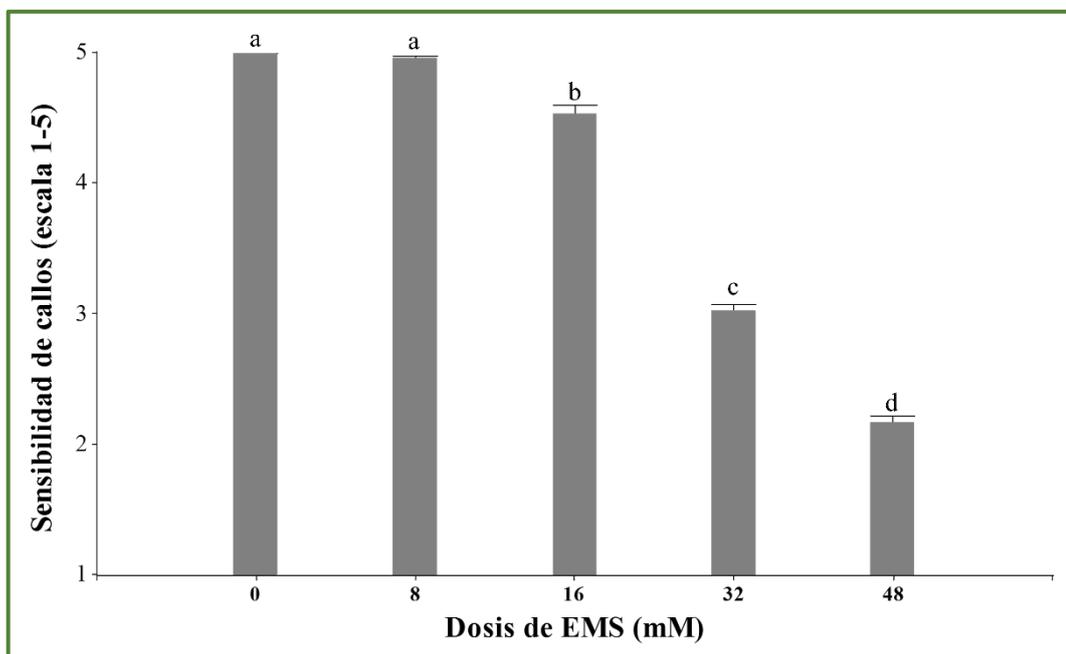
---

<sup>2</sup> Escala descrita en Materiales y Métodos (página 35) y presentada gráficamente en la Figura 2.2.

**Cuadro 3.9:** Medias  $\pm$  errores estándar para la sensibilidad de los callos del genotipo INTA CP 98-828 en los diferentes tratamientos mutagénicos.

Dosis de EMS	Sensibilidad de los callos (escala 1-5)
0 mM	4,99 $\pm$ 0,04 a
8 mM	4,96 $\pm$ 0,04 a
16 mM	4,53 $\pm$ 0,04 b
32 mM	3,02 $\pm$ 0,04 c
48 mM	2,16 $\pm$ 0,04 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )



**Figura 3.11:** Sensibilidad de los callos del genotipo INTA CP 98-828 en función de la dosis de EMS aplicada. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.2.3- Efecto de la dosis de EMS sobre la regeneración de plantas

La regeneración de plantas se indujo con luz en el medio MR suplementado con AIB, como se realizó en el ensayo de respuesta *in vitro*. En este caso, se observó que las plántulas tuvieron un leve retraso en su desarrollo, alcanzando una altura y raíz adecuadas para pasar a condiciones *ex vitro* a partir de las 16 semanas de cultivo.

La dosis de mutágeno aplicada sobre los callos embriogénicos del genotipo INTA CP 98-828 tuvo un efecto significativo sobre la capacidad de regeneración de plantas ( $P < 0,0001$ ).

Los valores más altos para RGmut se registraron en los tratamientos 0 mM y 8 mM, las cuales no difirieron significativamente, aunque se observaron diferencias entre las concentraciones restantes de EMS (Figura 3.12). En los tratamientos de 0 mM y 8 mM, donde los callos tuvieron un crecimiento normal, regeneraron aproximadamente 200 plántulas por placa de Petri con 15 explantes (~13 plantas/explante). Los callos tratados con la dosis de 16 mM regeneraron un promedio de 155 plántulas/placa (~10 plantas/explante) y la dosis de 32 mM un promedio 103 plántulas/placa (~7 plantas/explante). Finalmente, la dosis más alta (48 mM) exhibió el efecto más severo, este tratamiento mostró algunos callos con pequeños sectores embriogénicos, que regeneraron 38 plántulas/placa (~2 plantas/explante).

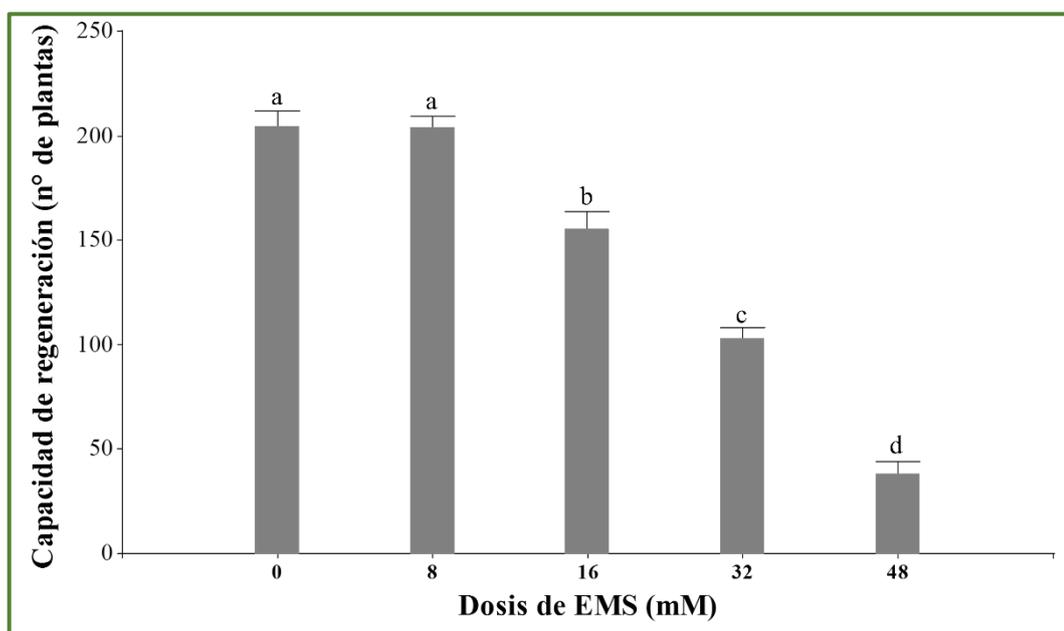
Como se observa en el Cuadro 3.10, la frecuencia de plantas albinas fue muy baja para todas las dosis, en un rango promedio de 0 a 0,04. Los tratamientos 0 mM y 8 mM no evidenciaron la presencia de albinismo en las plantas. En las dosis 16 mM y 32 mM se observaron plantas con distintos grados de albinismo y presencia de hojas rayadas, ambas dosis presentaron una FAMut de 0,01. La dosis más alta de 48 mM presentó la mayor cantidad de plantas completamente albinas, con una frecuencia promedio de 0,04.

Como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos, la capacidad de aclimatación (ACmut) de las plantas en invernáculo no pudo ser determinada y analizada estadísticamente. Sin embargo, se estimaron valores de ACmut para cada dosis cuantificando las plantas sobrevivientes sobre el total de plantas recuperadas de la infección fúngica. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.10. Las plantas de la dosis 48 mM no sobrevivieron a la infección.

**Cuadro 3.10:** Medias  $\pm$  errores estándar para la capacidad de regeneración del genotipo INTA CP 98-828, capacidad de aclimatación y frecuencia de plantas albinas en los diferentes tratamientos mutagénicos.

Dosis de EMS	Capacidad de regeneración (n° de plantas/placa)	Frecuencia de plantas albinas	Capacidad de aclimatación (%)
0 mM	204,55 $\pm$ 10,49 a	0,00	88,46%
8 mM	203,92 $\pm$ 9,63 a	0,00	82,00%
16 mM	155,08 $\pm$ 7,82 b	0,01	84,93%
32 mM	102,87 $\pm$ 4,88 c	0,01	83,53%
48 mM	38,33 $\pm$ 2,86 d	0,04	-

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba DGC -  $P > 0,05$ )



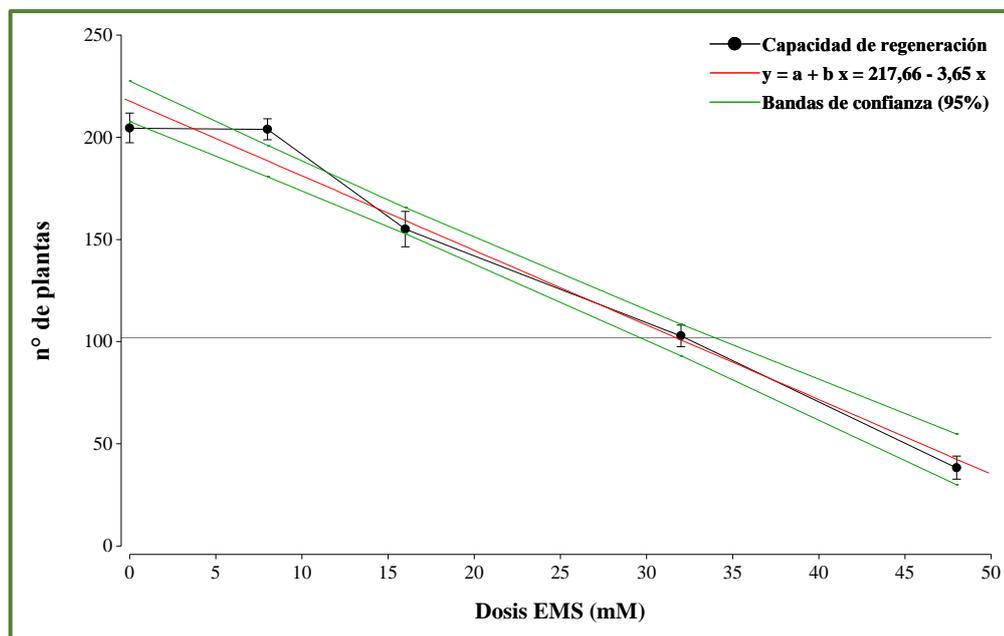
**Figura 3.12:** Capacidad de regeneración de plantas en función de la dosis de EMS aplicada. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ). Medias y errores estándar.

### 3.2.4- Estimación de la DL50 de EMS para la capacidad de recuperación de callos y para la regeneración de plantas

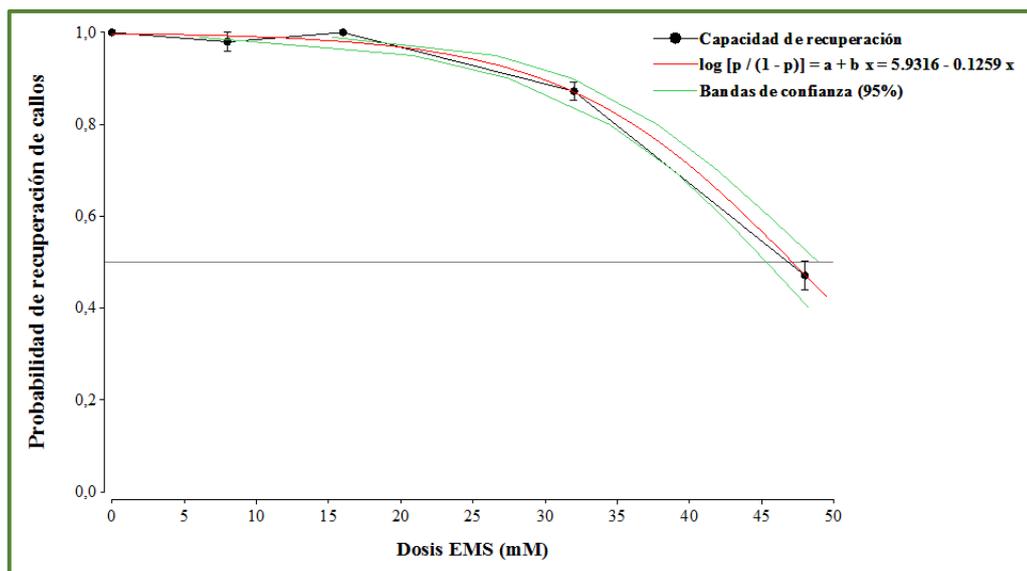
La DL50 para la capacidad de regeneración resultó 31,68 mM de EMS con un intervalo de confianza del 95% de 29,59 a 33,77 mM. A partir de esta información se decidió evaluar la variación somaclonal y el efecto del mutágeno en las dosis  $\leq 32$  mM.

La DL50 para la capacidad de recuperación de los callos fue 47,11 mM con un intervalo de confianza del 95% 45,31 de a 48,91 mM; lo cual demostró que las dosis por debajo de la DL50 para la regeneración permiten recuperar más del 50% de los callos con capacidad embriogénica.

Las Figuras 3.13 y 3.14 muestran las curvas de regresión obtenidas para cada variable y sus bandas de confianza.



**Figura 3.13:** Análisis de regresión lineal simple entre la capacidad de recuperación (n° de callos recuperados/n° callos tratados) y la dosis de EMS. Ajuste  $\pm 95\%$  de confianza,  $P < 0,0001$ ;  $n = 60$ .



**Figura 3.14:** Análisis de regresión logística entre la capacidad de regeneración (n° de plantas regeneradas) y la dosis de EMS. Ajuste  $\pm$  95% de confianza,  $P < 0,0001$ ;  $n = 90$ .

### 3.3- Evaluación de la variabilidad generada por los tratamientos mutagénicos y el cultivo *in vitro*

#### 3.3.1- Evaluación fenotípica en condiciones de invernáculo

Las plantas mutantes o somaclones obtenidos de los tratamientos mutagénicos se evaluaron durante su aclimatación y mantenimiento en invernáculo. Se observaron diferencias en el crecimiento de las plantas, principalmente en la altura, número de macollos y diámetro basal del tallo durante los primeros meses de desarrollo, pero debido a la infección fúngica que sufrieron las plantas durante su aclimatación, esta variación no pudo asociarse a los tratamientos mutagénicos o al cultivo *in vitro*. Los estadísticos descriptivos para cada carácter se encuentran en el ANEXO I: AI.13, a modo informativo. Luego de seis meses en invernáculo estos caracteres se estabilizaron y las plantas presentaron un estado de desarrollo homogéneo.

Por otro lado, ninguna planta presentó cambios en las hojas, tales como alteraciones en la coloración de la lámina o vaina, o cualquier otro tipo de variación atribuible a un efecto mutagénico. Sólo una planta del tratamiento 32 mM de EMS, denominada 32\_18, presentó

síntomas de roya marrón con un grado de susceptibilidad máximo (9) según la escala diagramática de Amarin, validada para evaluar esta enfermedad en caña de azúcar. Cabe destacar que el genotipo INTA CP 98-828 está descrito como tolerante a roya marrón, y ninguna otra planta presentó síntomas, incluyendo el testigo WT, por lo que esta nueva característica podría atribuirse al tratamiento con EMS y/o a la reproducción *in vitro*.

### **3.3.2- Evaluación fenotípica en condiciones de campo**

El ensayo de evaluación fenotípica se implantó en el campo en octubre de 2019, con una sobrevivencia del 100% de las plantas. Las evaluaciones fenotípicas comenzaron a mediados de mayo de 2020 y concluyeron el 12 de junio del mismo año con los análisis de calidad fabril.

#### **3.3.2.1- Análisis de la población total de plantas**

En el Cuadro 3.11 se resumen los estadísticos descriptivos que se estimaron sobre la población total de plantas, considerando los cuatro tratamientos (0, 8, 16 y 32) sin incluir el testigo (WT).

Los caracteres NT y PT mostraron la mayor variabilidad fenotípica, en tanto que el DT se mostró como el menos variable entre los componentes del rendimiento cultural. Las medias poblacionales para los caracteres NT, LT y LE fueron superiores ( $P < 0,05$ ) a las medias del testigo WT presentadas en el Cuadro 3.13, mientras que el NE y el PT presentaron valores similares ( $P > 0,05$ ) y el DT resultó significativamente menor al testigo ( $P < 0,05$ ) (ANEXO I: AI.14).

Los caracteres de calidad fabril fueron los menos variables fenotípicamente. Sin embargo, las medias poblacionales para los tres caracteres de calidad fueron superiores a las medias del testigo ( $P < 0,05$ ) (ANEXO I: AI.14).

**Cuadro 3.11:** Estadísticos descriptivos poblacionales estimados para los diferentes caracteres culturales y de calidad, sin incluir el testigo WT.

	<b>Carácter</b>	<b>Media</b>	<b>E.E.</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Caracteres culturales</b>	Número de tallos NT	10,39	0,18	23,87
	Longitud del tallo LT (cm)	226,21	1,57	9,77
	Diámetro de tallo medio DT (mm)	20,65	0,13	8,57
	Peso fresco de tallo individual PT (kg)	0,83	0,02	19,33
	Número de entrenudos NE	15,60	0,16	10,15
	Longitud de entrenudo LE (cm)	14,03	0,10	9,68
<b>Caracteres de calidad</b>	Contenido de sólidos solubles en jugo (°Bx)	20,08	0,08	3,80
	Pol por ciento en caña (Pol%ca)	14,58	0,08	5,21
	Rendimiento Fabril Estimado (RFE%)	11,07	0,07	6,02

### 3.3.2.2- Estimación de la variación $\sigma^2_b$ y $\sigma^2_w$

En el Cuadro 3.12 se encuentran los valores de la varianza entre ( $\sigma^2_b$ ) y dentro de los tratamientos ( $\sigma^2_w$ ) para cada carácter en estudio, estimadas mediante el ANOVA de los tratamientos, sin incluir al testigo (ANEXO I: AI.15) y el porcentaje de variabilidad fenotípica explicada por  $\sigma^2_w$ .

En todos los caracteres culturales y de calidad, la variación a causa de las diferencias entre los genotipos que forman parte de los tratamientos fue más importante que las diferencias en las expresiones medias entre tratamientos, donde en algunos casos los rangos entre los valores mínimos y máximos para cada tratamiento fueron amplios, aunque los promedios no difirieron. En todos los caracteres analizados, la varianza intra-tratamiento explicó más del 80% de la variabilidad fenotípica observada (Cuadro 3.12).

**Cuadro 3.12:** Estimación de la variación entre ( $\sigma^2_b$ ) y dentro de los tratamientos ( $\sigma^2_w$ ) y porcentaje de variabilidad explicada por  $\sigma^2_w$ .

Carácter	$\sigma^2_w$	$\sigma^2_b$	% explicado por $\sigma^2_w$
NT	6,090	0,069	98,87
LT	451,950	47,417	90,50
DT	2,980	0,204	93,59
PT	0,020	0,004	81,97
NE	2,410	0,129	94,93
LE	1,810	0,05	97,40
°Bx	0,510	0,095	84,27
Pol%ca	0,520	0,073	87,66
RFE%	0,410	0,049	89,36

### 3.3.2.3- Análisis de la variabilidad dentro de cada tratamiento y estimación del grado de determinación genética

En el Cuadro 3.13 y 3.14 se muestran las medias con sus respectivos errores estándar para cada tratamiento y el testigo (WT) y los parámetros genéticos, GDG y  $CV_G$ , estimados para cada tratamiento en los caracteres culturales y de calidad, respectivamente. En el ANEXO II se muestra información complementaria a los dos cuadros.

En las Figuras 3.15 y 3.16 puede observarse gráficamente el perfil de la variabilidad fenotípica entre y dentro de las dosis, representado gráficamente mediante gráficos Box-Plot. Los recuadros representan el rango intercuartílico y los límites inferior, medio y superior de cada recuadro representan el percentil 25, la mediana y el percentil 75, respectivamente. Las barras inferior y superior representan los valores mínimos y máximos registrados, respectivamente, o hasta 1,5 veces el rango intercuartílico. Cuando los datos se extienden más allá de esto, significa que hay valores atípicos en la serie, representados por puntos. La línea horizontal atraviesa la media del testigo.

**Cuadro 3.13:** Medias y parámetros genéticos estimados para los tratamientos y el testigo (WT) en los caracteres culturales.

	<b>Carácter</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>E.E.</b>	<b>CV<sub>G</sub> (%)</b>	<b>GDG</b>
<b>Caracteres culturales</b>	NT	0	10,70 <b>b</b>	0,32	16,96	0,66
		8	9,75 <b>b</b>	0,31	16,35	0,56
		16	10,40 <b>b</b>	0,30	15,82	0,60
		32	10,68 <b>b</b>	0,45	26,71	0,83
		WT	7,78 <b>a</b>	0,25	-	-
	LT (cm)	0	215,34 <b>a</b>	2,99	6,18	0,40
		8	230,56 <b>b</b>	3,19	6,87	0,53
		16	227,26 <b>b</b>	2,91	5,93	0,44
		32	231,86 <b>b</b>	3,01	6,38	0,49
		WT	218,26 <b>a</b>	2,27	-	-
	DT (mm)	0	20,47 <b>a</b>	0,22	0,00	0,00
		8	21,42 <b>b</b>	0,23	2,15	0,09
		16	20,53 <b>a</b>	0,27	5,09	0,31
		32	20,24 <b>a</b>	0,26	4,35	0,24
		WT	21,56 <b>b</b>	0,21	-	-
	PT (kg)	0	0,77 <b>a</b>	0,03	12,46	0,46
		8	0,93 <b>b</b>	0,02	5,48	0,26
		16	0,79 <b>a</b>	0,03	17,79	0,66
		32	0,83 <b>a</b>	0,03	12,47	0,54
		WT	0,80 <b>a</b>	0,02	-	-
NE	0	16,04 <b>a</b>	0,21	2,89	0,20	
	8	15,93 <b>a</b>	0,31	7,36	0,61	
	16	15,42 <b>a</b>	0,32	8,08	0,62	
	32	15,02 <b>a</b>	0,38	10,34	0,71	
	WT	15,64 <b>a</b>	0,20	-	-	
LE (cm)	0	14,25 <b>b</b>	0,17	6,31	0,54	
	8	14,32 <b>b</b>	0,19	7,07	0,60	
	16	13,73 <b>b</b>	0,18	6,97	0,56	
	32	13,85 <b>b</b>	0,21	8,93	0,68	
	WT	12,39 <b>a</b>	0,14	-	-	

E.E.: error estándar, CV<sub>G</sub>: coeficientes de variación genética, GDG: Grado de determinación genética.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba LSD -  $P > 0,05$ ).

Información complementaria en ANEXO II: AII.1 y AII.2.

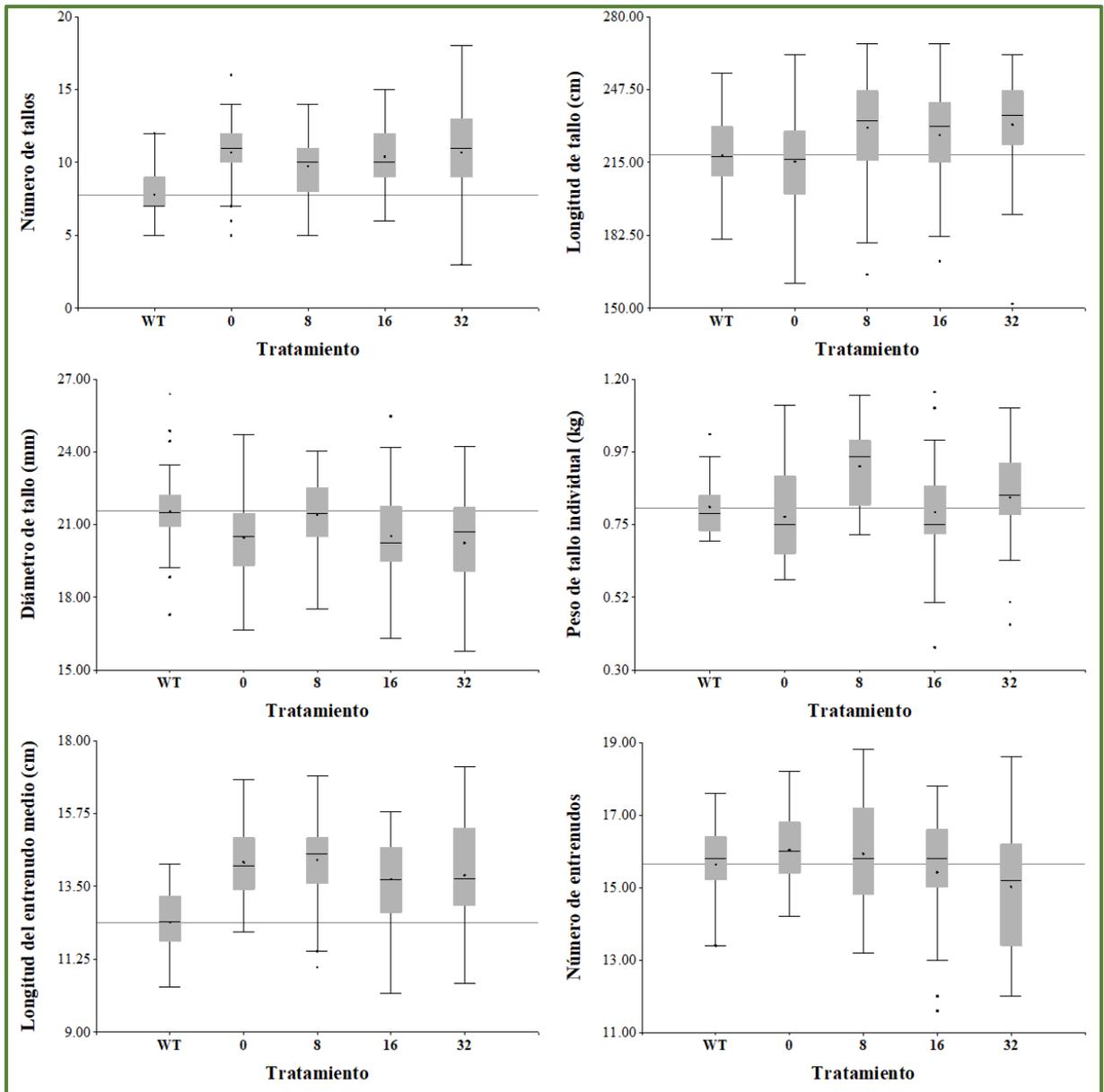
**Cuadro 3.14:** Medias y parámetros genéticos estimados para los tratamientos y el testigo (WT) en los caracteres de calidad fabril.

	<b>Caracter</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>E.E.</b>	<b>CV<sub>G</sub> (%)</b>	<b>GDG</b>
<b>Caracteres de calidad fabril</b>	°Bx	0	19,61 <b>a</b>	0,20	4,32	0,78
		8	20,22 <b>b</b>	0,13	2,21	0,51
		16	20,07 <b>b</b>	0,11	1,70	0,37
		32	20,40 <b>b</b>	0,12	1,91	0,45
		WT	19,77 <b>a</b>	0,09	-	-
	Pol%ca	0	14,15 <b>a</b>	0,20	6,26	0,82
		8	14,70 <b>b</b>	0,12	2,70	0,49
		16	14,64 <b>b</b>	0,12	3,11	0,56
		32	14,86 <b>b</b>	0,12	2,94	0,55
		WT	14,35 <b>a</b>	0,08	-	-
	RFE%	0	10,70 <b>a</b>	0,18	7,21	0,80
		8	11,15 <b>b</b>	0,10	2,79	0,42
		16	11,12 <b>b</b>	0,11	3,77	0,57
		32	11,29 <b>b</b>	0,11	3,43	0,54
		WT	10,88 <b>a</b>	0,08	-	-

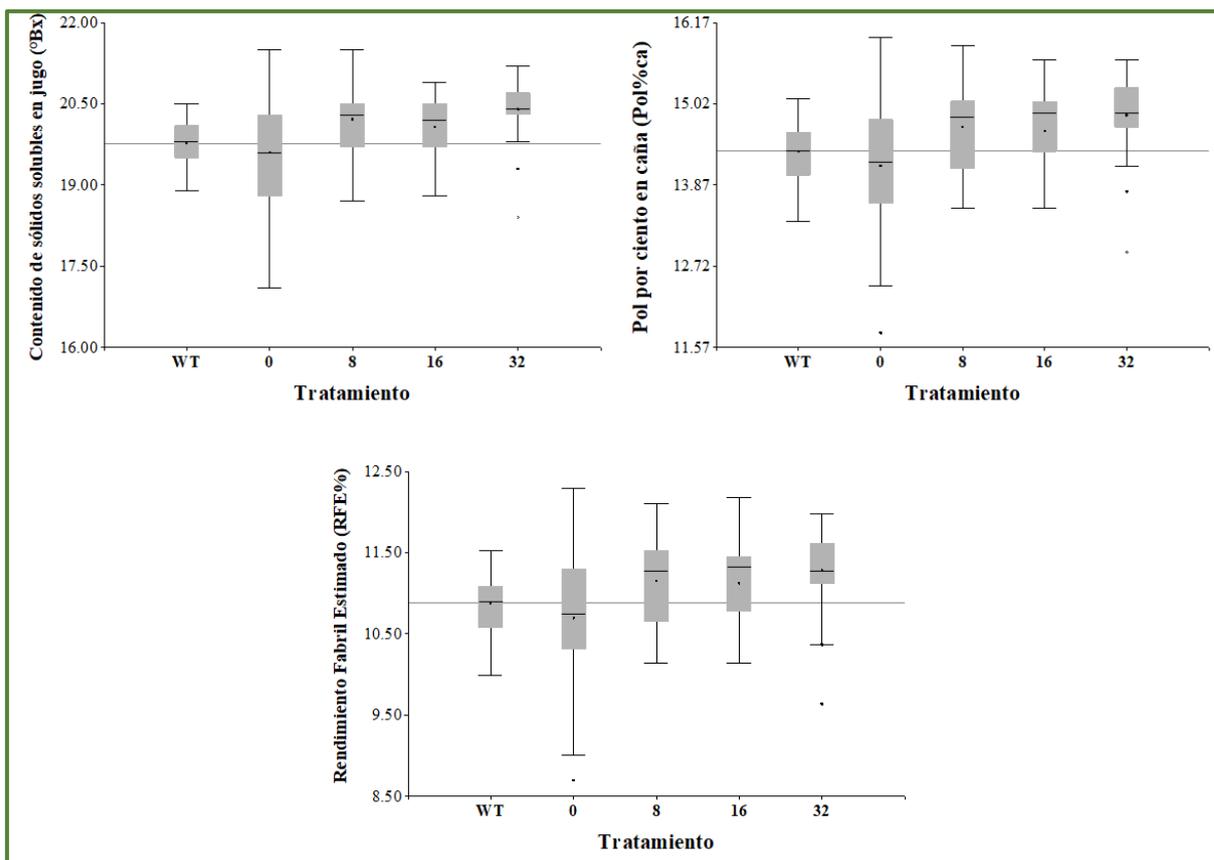
E.E.: error estándar, CV<sub>G</sub>: coeficientes de variación genética, GDG: Grado de determinación genética.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Prueba LSD -  $P > 0,05$ )

Información complementaria en ANEXO II: AII.3 y AII.4.



**Figura 3.15:** Distribución de medias y dispersión para los caracteres culturales en los tratamientos (0, 8, 16 y 32) y el testigo WT.  $n = 50$  para cada tratamiento en NT, LT, DT y LE.  $n = 25$  para cada tratamiento en PT y NE.



**Figura 3.16:** Distribución de medias y dispersión para los caracteres de calidad fabril en los tratamientos (0, 8, 16 y 32) y el testigo WT.  $n = 25$  para cada tratamiento.

### ❖ Número de tallos

Todos los tratamientos presentaron mayor NT respecto al testigo al comparar las medias (Cuadro 3.13 y Figura 3.15), pero no hubo diferencias significativas entre las dosis de EMS y el tratamiento de variación somaclonal.

El NT fue uno de los atributos más variable fenotípicamente dentro de los tratamientos. En los tratamientos 0, 8 y 16, alrededor del 60% de la variación fenotípica fue explicada por variación genética, según su GDG, y el 40% restante se debió a variación ambiental, estimada a través del testigo. Mientras que en la dosis 32 mM de EMS, el 83% de la variación fenotípica observada se adjudicó a un origen genético. En esta dosis, el NT varió en un rango de 3-18 tallos molibles, con un  $CV_G$  de 26,71%, mientras que el  $CV_G$  para los demás tratamientos fue alrededor de 16%. En las dosis 8 y 16 mM de EMS la variación genética estaría asociada

principalmente a variación somaclonal, mientras que en la dosis 32 mM la variación genética se incrementó por efecto del mutágeno.

#### ❖ Longitud del tallo

Para la variable LT no se encontraron diferencias significativas entre la media del testigo y el tratamiento 0, mientras que las tres dosis de EMS presentaron valores de LT superiores al testigo y al tratamiento 0, sin diferir estadísticamente entre ellas (Cuadro 3.13 y Figura 3.15).

En cuanto a la variación genética, todos los tratamientos presentaron valores GDG medios. El 40% de la variación fenotípica observada para este atributo puede explicarse por causas de origen genético debido al cultivo *in vitro* (tratamiento 0), con un  $CV_G$  de 6,18%. Para este carácter habría un importante componente de variación somaclonal sobre la variación genética en todos los tratamientos, con incrementos debido a la aplicación del mutágeno. En las dosis de EMS, de un 44-53% de la variación se adjudicó a causas genéticas, con  $CV_G$  de aproximadamente de 6-7%, acompañada de mayores expresiones medias respecto al tratamiento 0 y al WT.

#### ❖ Diámetro del tallo medio

En el atributo DT se observó una disminución significativa de la media en los tratamientos 0, 16 y 32, mientras que la dosis 8 no presentó diferencias respecto al testigo (Cuadro 3.13 y Figura 3.15).

En los tratamientos 0 y 8, prácticamente toda la variación fenotípica se atribuyó a causas de origen ambiental, GDG 0,00 y 0,09 respectivamente. Por otro lado, en las dosis 16 y 32 mM de EMS hubo alrededor de un 25-30% de variación de origen genético.

La variación fenotípica para este carácter fue principalmente de origen ambiental, aunque se observó una mayor variación genética en las dosis más altas de EMS, con  $CV_G$  de 5,09 y 4,35% para las dosis 16 y 32 mM, respectivamente.

### ❖ **Peso fresco de tallo individual**

El PT fue el atributo que más varió fenotípicamente dentro y entre los tratamientos (Figura 3.15). Sin embargo, solo la media de la dosis 8 mM se diferenció estadísticamente del testigo, siendo superior a este (Cuadro 3.13). Pero en este tratamiento sólo el 26% de la variación fenotípica tuvo origen genético ( $CV_G$  5,48%).

Al igual que con la LT, se observó nuevamente un importante componente de variación somaclonal en la variación genética debida a la reproducción *in vitro* donde, en el tratamiento 0, el 46% de la variación fenotípica fue explicada por causas de origen genético ( $CV_G$  12,46%). Por otro lado, las dosis más altas de mutágeno, 16 y 32 mM, presentaron valores de GDG aún más altos, donde el 66% ( $CV_G$  17,79%) y el 54% ( $CV_G$  12,47%) de la variabilidad fenotípica, respectivamente, fue explicada por variación genética debido al cultivo *in vitro* y al tratamiento mutagénico.

### ❖ **Número de entrenudos**

Las expresiones medias del NE de los tratamientos no presentaron diferencias significativas con el testigo (Cuadro 3.13 y Figura 3.15).

En el tratamiento de variación somaclonal (0), sólo un 20% ( $CV_G$  2,89%) de la variación fue de origen genético. Sin embargo, cuando se analizó la variabilidad de las dosis de EMS, se encontró que la variación fenotípica fue explicada por variación de origen genético en un 60% ( $CV_G$  7-8%) en las dosis 8 y 16 mM, y en un 71% ( $CV_G$  10,34%) en la dosis 32 mM. Por lo tanto, la aplicación de EMS incrementó la variabilidad en este atributo.

### ❖ **Longitud de entrenudo**

La media de la LE fue significativamente superior en todos los tratamientos respecto al genotipo *wild type* (Cuadro 3.13 y Figura 3.15).

Nuevamente, se observó sobre este atributo un importante aporte de variación somaclonal sobre la variación genética, con incrementos al aplicar las distintas dosis de mutágeno. El 54%

de la variación fenotípica observada se debió a la reproducción *in vitro*, con un  $CV_G$  de 6,31%. Para este carácter, la dosis más variable fue la de 32 mM de EMS, con  $CV_G$  de 8,93% y un 68% de la variabilidad explicada por causas de origen genético.

#### ❖ Caracteres de calidad fabril

En los atributos de calidad, °Bx, Pol%ca y RFE%, no hubo diferencias significativas entre las medias del testigo y el tratamiento 0, mientras que las medias poblacionales de los tratamientos mutagénicos fueron superiores al *wild type* y al tratamiento de variación somaclonal (Cuadro 3.14).

En cuanto a la variabilidad, los tres caracteres de calidad tuvieron comportamientos similares. El tratamiento 0 fue el más variable (Cuadro 3.14), donde aproximadamente el 80% de la variación tuvo un origen genético debido a la variación somaclonal. Por otro lado, los tratamientos mutagénicos presentaron valores medios de GDG, donde alrededor del 50% de la variabilidad fenotípica estuvo explicada por variación genética, pero con un incremento en la media poblacional.

En la Figura 3.16 se puede observar cómo disminuye la variación en los tratamientos de EMS con respecto al tratamiento de variación somaclonal (0), acompañado de un aumento de la media.

#### ❖ Otros caracteres

Durante todo el desarrollo de las plantas en campo, se puso atención a cualquier otro tipo de cambio visible en las plantas, morfológico o fisiológico, que pueda atribuirse al tratamiento como efecto mutagénico o de variación somaclonal, principalmente en hojas y yemas y presencia de síntomas de enfermedades. Sin embargo, no se observó ningún tipo de alteración en hojas o yemas durante el desarrollo del ensayo. En cuanto a la presencia de enfermedades, la misma planta (32\_18) que presentó síntomas de roya marrón en invernáculo, presentó la misma severidad durante todo el ensayo.

#### **3.3.2.4- Análisis general y elección de la dosis óptima de mutágeno para generar variabilidad**

Teniendo en cuenta la variación genética generada en los tratamientos y las diferencias en las expresiones medias con respecto al testigo *wild type*, se observó una fuerte presencia de variación somaclonal en la mayoría de los caracteres culturales, tales como número de tallos, longitud de tallo, peso fresco de tallo individual, longitud del entrenudo y en los tres caracteres de calidad fabril. Esta variación era esperada, teniendo en cuenta los antecedentes de variación somaclonal para estos atributos en el cultivo. Sin embargo, se observó un incremento de la variación genética en los caracteres culturales debido a los tratamientos mutagénicos aplicados, principalmente en la dosis 32 mM de EMS. Por otro lado, en la longitud de tallo y en los caracteres de calidad se registró un aumento significativo de la media en los tratamientos mutagénicos respecto al tratamiento 0, donde alrededor del 50% de la variabilidad fenotípica fue de origen genético, debida al efecto conjunto del cultivo *in vitro* y la aplicación de EMS.

A pesar de haber pocas diferencias en las expresiones medias entre las dosis de mutágeno, el tratamiento con una concentración de 32 mM de EMS se destacó por tener expresiones medias fenotípicas superiores al testigo en la mayoría de los caracteres de culturales y en todos los atributos de calidad, además de presentar valores de GDG en un rango medio a alto para todos los caracteres, a excepción del diámetro de tallo.

## DISCUSIÓN

### 4.1- Respuesta de los genotipos de caña de azúcar de INTA a la embriogénesis somática

Gran parte de la investigación actual en biotecnología de la caña de azúcar se centra en el mejoramiento molecular, principalmente en el estudio del genoma y el mejoramiento asistido por marcadores. No obstante, el desarrollo del cultivo *in vitro* fue un punto de inflexión en la investigación biotecnológica de la caña de azúcar, sentando las bases para la aplicación de nuevas técnicas de mejora, como la transgénesis y la mutagénesis aplicada *in vitro* (Lakshmanan, 2006). La gran cantidad de protocolos establecidos para el manejo de material *in vitro* ofrecen estrategias únicas para hacer frente a las limitaciones en la diversidad genética, propagación y conservación, que actualmente limitan a las industrias cañeras en todo el mundo (Snyman et al., 2011).

La embriogénesis somática, como método rápido y con baja frecuencia de quimerismo, es la ruta morfogénica de preferencia para la regeneración de plantas en las técnicas de mejoramiento independientes del cruzamiento sexual (Suprasanna et al., 2012). Hay numerosos trabajos disponibles sobre protocolos para inducir embriogénesis somática en caña de azúcar, con variadas condiciones y formulaciones de medios de cultivo (Ho y Vasil, 1983; Taylor et al., 1992; Liu, 1993; Niaz y Quraishi, 2002; Snyman, 2004; Mahlanza et al., 2019; Nogueira et al., 2019). Sin embargo, los protocolos no siempre se ajustan a todos los cultivares de caña de azúcar. En este sentido, esta ruta está limitada por los fuertes efectos de la dependencia del genotipo. Para realizar este trabajo de tesis, se realizó una revisión bibliográfica y se eligieron las mejores condiciones de cultivo reportadas, basándose principalmente en el protocolo propuesto por Snyman (2002, 2004) para transformación genética, con modificaciones, de acuerdo a otros trabajos consultados y discutidos en este capítulo.

En este trabajo se estudió la respuesta a la embriogénesis somática indirecta de cinco cultivares de caña de azúcar desarrollados y/o seleccionados por el PMGCA de INTA, con el fin de encontrar genotipos capaces de completar todo el ciclo de cultivo *in vitro* a través de embriogénesis somática, para posteriores ensayos de mutagénesis *in vitro*. Estos cultivares se

evaluaron en cuanto al establecimiento de los explantes, la capacidad para producir embriones somáticos, la regeneración de plántulas, y la capacidad de aclimatación en condiciones *ex vitro*, hasta llegar al campo. Como informaron estudios previos sobre la caña de azúcar, los genotipos mostraron una gran variabilidad en su respuesta a las diferentes etapas de cultivo *in vitro* (Chen et al., 1988; Liu, 1993; Snyman et al., 1996; Niaz y Quraishi, 2002; Marcano et al., 2002; Gandonou et al., 2005; Alcantara et al., 2014; Solangi et al., 2016; Kaur y Kapoor, 2016; Mittal et al., 2016; Nogueira et al., 2019).

#### **4.1.1- Elección de los explantes y capacidad de establecimiento de los genotipos**

Las hojas inmaduras y las inflorescencias en desarrollo son los tejidos con mejor respuesta para la producción rápida de callos embriogénicos (Lakshmanan, 2006). En las condiciones de cultivo de caña de azúcar de Tucumán la floración no ocurre naturalmente y, por lo tanto, el uso de inflorescencias requeriría previamente la inducción floral de las plantas donantes. Por este motivo, se utilizaron las hojas inmaduras (*leaf roll*), teniendo en cuenta las observaciones descritas por Ho y Vasil (1983) para la extracción de explantes. En dicho estudio los autores señalan que la frecuencia y el vigor de la formación de callos embriogénicos dependen de la edad de la hoja y la distancia de los explantes del ápice, siendo las hojas 4-5 las más adecuadas para la inducción de callo embriogénico y la formación de embriones, tomadas dentro de los 5 cm desde el ápice. En un experimento previo con el material de referencia NA 85-1602, en la EEA Famaillá, se observó que las plantas donantes inducidas a floración presentan explantes que se oxidan completamente y no se establecen en cultivo, por consiguiente, los explantes que presentaron esta condición se excluyeron del estudio.

Teniendo en cuenta las consideraciones señaladas para la extracción de explantes, los genotipos de INTA presentaron valores altos de establecimiento, superando el 90% de explantes establecidos *in vitro*. Asimismo, otros estudios reportaron altos valores de capacidad de establecimiento, también denominado “porcentaje de inducción de callo”, utilizando concentraciones de 2,4-D iguales y menores a las de este estudio (Niaz y Quraishi, 2002; Gandonou et al., 2005; Chen et al., 1988; Kaur y Kapoor, 2016). Por otro lado, los niveles de contaminación resultaron mínimos siguiendo el protocolo de desinfección de explantes propuesto por Ho y Vasil (1983) y no se observaron efectos adversos de los desinfectantes sobre

el tejido vegetal, lo cual puede ocurrir dependiendo de las características morfológicas de los cogollos en distintos genotipos.

En los primeros días de establecimiento, se observó oxidación de los explantes, la cual se disipó en los siguientes días de cultivo. Cuando las plantas se lesionan durante la preparación de los explantes, los compuestos fenólicos que se encuentran en gran medida en las vacuolas, se mezclan con el contenido de los plástidos y otros orgánulos y, en consecuencia, aparece una pigmentación oscura (Kaur y Kapoor, 2016). Estos compuestos, altamente reactivos, pueden tener un efecto letal sobre los explantes. En el trabajo de Kaur y Kapoor (2016), se reportó que los días para la iniciación del callo variaron entre los genotipos y estuvieron inversamente relacionados con la intensidad del oscurecimiento del medio, ya que se obstaculiza la absorción de nutrientes por parte del explante, lo que resulta en una disminución de callo. En los genotipos de INTA, no se observaron diferencias en el tiempo de aparición de callo, el cual comenzó aproximadamente siete días después del establecimiento. En el caso de estos genotipos, la oxidación fue insignificante, sin efecto perjudicial sobre los tejidos, permitiendo un rápido desarrollo de callo sobre el explante. El tiempo de iniciación de callo fue similar a los genotipos CoJ64 y CoJ86 (8 días) y menor a CoJ83 (12 días), reportados por Kaur y Kapoor (2016).

#### **4.1.2- Dependencia del genotipo en la producción de callo embriogénico**

Los callos embriogénicos son los más aptos tanto para la aplicación de un mutágeno *in vitro* (Suprasanna et al., 2012), para transformación genética (Snyman et al., 1996), como para la crioconservación de germoplasma y producción de semillas sintéticas (Lakshmanan, 2006). Este tipo de callo es amarillento con estructuras globulares de superficie lisa, que se blanquean durante el desarrollo del callo, las cuales son capaces de regenerar plantas completas. Con los dos protocolos de inducción que se probaron en este trabajo, los explantes de todos los genotipos formaron los diferentes tipos de callos descritos por Ho y Vasil (1983) y Taylor et al. (1992). Como describen Ho y Vasil (1983), la mayoría de los callos se originaron en la superficie abaxial (inferior) de los explantes, aunque también se formaron a partir de la superficie adaxial. Se observó la formación de callo embriogénico (Tipo 3) en cuatro genotipos de INTA, los cuales mostraron una respuesta diferencial a los protocolos de inducción. Los resultados concuerdan con otros estudios (Ali et al., 2007a; Mittal et al., 2009), en los cuales la

capacidad embriogénica dependió de la interacción del genotipo con el medio de cultivo. La dependencia del genotipo en la formación de callo embriogénico fue descrita en otros estudios, con cultivares de caña de azúcar desarrollados por programas de mejoramiento de Brasil (Dibax et al., 2011; Alcantara et al., 2014; Nogueira et al., 2019), Venezuela (Marcano et al., 2002), Sudáfrica (Snyman et al., 1996), Taiwán (Chen et al., 1988), India (Kaur y Kapoor, 2016; Mittal et al., 2016), Pakistán (Solangi et al., 2016) y Estados Unidos (Gandonou et al., 2005); y en cinco especies de *Saccharum* (Chen et al., 1988).

La capacidad de formar callo Tipo 3 no depende exclusivamente del genotipo, sino de su interacción con los componentes del medio de cultivo. En efecto, según los resultados obtenidos en el presente trabajo, los cultivares INTA CP 98-828, INTA NA 89-686 e INTA NA 91-209 se podrían clasificar como altamente embriogénicos, el cv. L 91-281 como medio, mientras que el cv. FAM 81-820 no presentó capacidad embriogénica con los protocolos testeados. Chen et al. (1988) observaron gran variabilidad en la capacidad embriogénica (28-92%) de cinco cultivares comerciales. Mientras que, Niaz y Quraishi (2002) y Gandonou et al. (2005) reportaron genotipos con capacidad embriogénica mayor a 60%. También, Alcantara et al. (2014) observaron porcentajes de callo Tipo 3 superiores a 60%, inducidos solo con 2,4-D. En similares condiciones de cultivo, otros estudios observaron genotipos recalcitrantes para la producción de embriones (Snyman et al., 1996; Nogueira et al., 2019). Cabe destacar, que otras formulaciones de medio, principalmente con diferentes reguladores de crecimiento, podrían mejorar la capacidad embriogénica de L 91-281 e inducir la formación de este tipo de callo en FAM 81-820. En algunos genotipos, la adición de BAP (6-benzilaminopurina) y/o KIN (kinetina) en distintas concentraciones incrementó la formación de callo embriogénico (Ali et al., 2007a, Kaur y Kapoor, 2016) mientras que, en otros genotipos, tendió a disminuirla (Alcantara et al., 2014). Algunos cultivares venezolanos respondieron mejor al efecto inductivo del dicamba que el 2,4-D (Marcano et al., 2002). Así también, el cambio de la fuente de carbono, de sacarosa a maltosa (30 g/L) y la adición de prolina incrementó la masa de callo embriogénico en cultivares indios de caña de azúcar (Kaur y Kapoor, 2016). Un estudio reciente reportó que el metilglioxal en bajas concentraciones aumentó la masa de callo, favoreció la maduración de embriones y promovió la formación de brotes en los genotipos NCo376 y N41 de caña de azúcar (Mahlanza et al., 2019). La gran variedad de trabajos referidos a las respuestas de los genotipos a las diferentes condiciones de cultivo *in vitro* muestra la dependencia genotípica de esas respuestas. Esta dependencia del genotipo en la embriogénesis somática sigue siendo un área

de investigación, que a menudo requiere un esfuerzo considerable de naturaleza empírica. Se espera que las técnicas avanzadas de transcriptómica y proteómica de alto rendimiento permitan identificar genes asociados como indicadores genéticos de la embriogénesis somática (Rose y Song, 2017).

#### **4.1.3- Efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción y maduración del callo embriogénico**

Como en la mayoría de los miembros de Poaceae, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la auxina más potente para la inducción de callos embriogénicos en caña de azúcar (Ho y Vasil, 1983), aunque se han utilizado otras auxinas sintéticas como picloram y dicamba (Irvine et al., 1983; Marcano et al., 2002; Alcantara et al., 2014). Varios estudios señalan que la mejor concentración de 2,4-D es 3 mg/L (Nadar et al., 1978; Taylor et al., 1992; Niaz y Quraishi, 2002; Snyman, 2004; Alcantara et al., 2014), pero el posterior crecimiento y desarrollo de embriones somáticos requiere su eliminación o un medio con un nivel reducido de 2,4-D (Nadar et al., 1978). Por otro lado, los niveles elevados de auxinas obstaculizan el desarrollo de proembriones y transforman el callo embriogénico en uno no embriogénico (Ho y Vasil, 1983; Guiderdoni y Demarly, 1988; Taylor et al., 1992; Alcantara et al., 2014).

En este estudio, entre los dos protocolos de inducción probados, se observó una mejor maduración de los embriones somáticos siguiendo el protocolo MS3/MS1, con una reducción de 2,4-D de 3 a 1 mg/L en la última etapa de la callogénesis. Otros estudios, utilizaron protocolos con reducción de la concentración de 2,4-D para promover la formación de los embriones (Guiderdoni y Demarly, 1988; Snyman, 2002; Dibax et al., 2011). Nadar et al. (1978) explican que el proceso de desdiferenciación e iniciación de células embriogénicas requiere concentraciones de auxina relativamente altas, pero se requieren concentraciones de auxina más bajas para la etapa de maduración de los embriones somáticos. Chen et al. (1988) sugieren que alternar un régimen bajo-alto de 2,4-D es esencial para mantener la morfogénesis a largo plazo, incluso después de 30 meses de cultivo.

La variación en los niveles de 2,4-D influye tanto en la callogénesis como en la embriogénesis. En efecto, la alta especificidad del 2,4-D para la callogénesis en caña de azúcar podría atribuirse a la presencia de supuestos receptores 2,4-D (proteínas de unión a auxina)

presentes en la superficie de la membrana celular del explante. El cultivo de los explantes en un medio que contiene 2,4-D aumenta los niveles de auxina endógena y el transporte polar de las auxinas endógenas (IAA) es esencial para el establecimiento de la simetría bilateral durante la embriogénesis en monocotiledóneas (Wekesa, 2017).

Karp (1995) e Irvine et al. (1983) concuerdan que la auxina más usada para la formación de callo en gramíneas es el 2,4-D, aunque con su empleo se observan irregularidades cromosómicas y cambios en la expresión génica. Altas concentraciones de reguladores de crecimiento, incluyendo 2,4-D, pueden incrementar la variación somaclonal (Lakshmanan, 2006). Esta propiedad del 2,4-D se consideró beneficiosa para este trabajo, donde el objetivo del cultivo de tejidos fue generar variabilidad genética.

#### **4.1.4- Discusión sobre el origen unicelular de los embriones somáticos**

Una característica importante de las plantas derivadas de embriogénesis somática es el origen unicelular de los embriones, lo cual supone la ausencia de quimerismo, logrando una planta genéticamente uniforme.

En la embriogénesis somática, cuando hay una fase de callo, se desarrolla una masa proembriogénica (PEM), que consiste en células más pequeñas ricas en citoplasma. Esencialmente, estas células podrían considerarse como células madre totipotentes de las que deriva el embrión. Existe la opinión que los embriones somáticos no siempre pueden derivarse de una sola célula PEM sino de un grupo de células. Parece probable que el origen del embrión somático se remonta a una sola célula, pero no se puede excluir la incorporación de otras células al embrión a medida que se acerca el estadio globular (Rose y Song, 2017).

En caña de azúcar, se ha informado el origen unicelular de los embriones somáticos en varios estudios y revisiones del tema (Haccius, 1978; Nadar et al., 1978; Ho y Vasil, 1983; Guiderdoni y Demarly, 1988; Snyman et al., 2011). La formación de los embriones comienza en las células PEM, situadas en la periferia del callo embriogénico de caña de azúcar (Ho y Vasil, 1983). Sin embargo, otros estudios coinciden en una baja frecuencia de embriones originados de unas pocas células (Gandonou et al. 2005, Alcantara et al. 2014, Nogueira et al. 2019). En estudios de microscopía, se observó la presencia de una célula suspensora en la base

globular del proembrión, conectándolo al callo nodular compacto (Ho y Vasil, 1983; Guiderdoni y Demarly, 1988; Alcantara et al., 2014; Nogueira et al., 2019). La existencia de células suspensoras apunta al origen unicelular de los embriones, aunque también se detectaron unos pocos embriones somáticos de origen multicelular. De acuerdo con Sané et al. (2006) (citado en Nogueira et al., 2019), el origen unicelular es la forma típica del desarrollo de embriogénesis donde la célula competente se divide activamente dentro de una capa externa de polisacárido que proporciona aislamiento físico de las células adyacentes. Claramente, en caña de azúcar el origen de los embriones somáticos es principalmente unicelular, con una baja frecuencia de embriones originados a partir de unas pocas células. Esto presenta a la embriogénesis somática como una vía adecuada para la inducción de mutaciones o transformación genética, con una baja frecuencia de quimerismo y alta frecuencia de plantas homohísticas.

Según Geier (2012), la regeneración adventicia de brotes y la embriogénesis somática son los medios más eficientes para evitar la formación de quimeras en mutagénesis inducida. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los embriones somáticos primarios generalmente derivan de células individuales, mientras que los embriones secundarios, que surgen de los primeros, pueden ser de origen multicelular. En consecuencia, puede producirse cierto grado de quimerismo cuando se aplica un tratamiento mutagénico a los embriones somáticos, en lugar de los explantes o los callos embriogénicos. Esta consideración se tuvo en cuenta en los ensayos mutagénicos, aplicando el mutágeno en callos embriogénicos e induciendo la formación de embriones con posterioridad al tratamiento.

#### **4.1.5- Capacidad de regeneración de los genotipos**

Al traspasar los callos embriogénicos a condiciones de luz y eliminar la auxina o disminuir su concentración, se induce el desarrollo de los embriones somáticos (Nadar et al., 1978; Ho y Vasil, 1983; Irvine et al., 1983; Chen et al., 1988; Taylor et al., 1992). En el protocolo MS3 la maduración de los embriones podría haber comenzado en el medio de regeneración, en ausencia de auxinas. De esta manera, el protocolo MS3/MS1 iniciaría precozmente la maduración de embriones y la regeneración podría ser más rápida, sin embargo, las diferencias en el tiempo de regeneración no se registraron en este trabajo.

La bipolaridad es una característica importante de la embriogénesis somática (Ho y Vasil, 1983). En todos los genotipos evaluados en este estudio, la formación de brotes y raíces ocurrió simultáneamente, demostrando que la vía morfogénica fue la embriogénesis. Por otro lado, el medio de regeneración se suplementó con AIB para promover la formación de raíces (Snyman, 2002), en una concentración de 5 mg/L, indicada por Mustafa y Khan (2016) como la más eficiente para el enraizamiento en caña de azúcar. Otros estudios lograron la regeneración de plantas completas en ausencia de reguladores de crecimiento (Snyman et al., 1996; Marcano et al., 2002; Gandonou et al., 2005; Dibax et al., 2011), mientras que otros necesitaron la adición de citoquininas (Ali et al., 2007a; Alcantara et al., 2014). En este último estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre medios suplementados con diferentes concentraciones de AIB, por lo que éste podría no ser necesario para la inducción de raíces en algunos genotipos.

Diversos estudios señalan que la capacidad de regeneración es específica y un fenómeno dependiente del genotipo y, en consecuencia, algunos cultivares de caña de azúcar son recalcitrantes (Heinz y Mee, 1969; Gandonou et al., 2005; Sughra et al., 2014; Kaur y Kapoor, 2016). En este trabajo, se observó que la capacidad de regeneración de los genotipos estuvo afectada únicamente por el genotipo, independientemente del protocolo de inducción de callo embriogénico utilizado. En el estudio de Nogueira et al. (2019), el número promedio de plantas formadas por explante fue significativamente diferente entre los cultivares. Estos autores reportan la influencia del tiempo en la capacidad de regeneración de los callos ya que observaron que los genotipos con mejor respuesta tuvieron un promedio de 19 plantas/explante en callos embriogénicos de 40 días y 5 plantas/explante en callos de 80 días. En el presente estudio se encontraron resultados similares, con un promedio de regeneración de 13 y 12 plantas/explante en el cv. INTA CP 98-828 con los protocolos MS3/MS1 y MS3 respectivamente, en callos embriogénicos de 60 días.

La elección de un genotipo potencial para mejoramiento *in vitro* depende fundamentalmente de su capacidad para regenerar plantas completas, por lo tanto, éste es un parámetro crítico de decisión. Aunque la tasa de germinación de los embriones somáticos es muy pobre en la mayoría de los cultivos (Suprasanna et al., 2012), en este trabajo se obtuvo un número considerable de plantas por genotipo, en un rango entre 706 a 2466 plantas totales a partir de diez cogollos de caña de azúcar.

#### **4.1.6- Correlación entre la producción de callo embriogénico y la capacidad de regeneración**

Se observó una correlación positiva entre la capacidad embriogénica y el porcentaje de callo Tipo 3, lo cual significa que los genotipos en los que un mayor número de explantes formaron callo embriogénico, también tuvieron un mayor porcentaje de embriones sobre el volumen total del callo. Por otro lado, no hubo una correlación entre la capacidad de establecimiento con las variables relacionadas a la producción de callo embriogénico, lo cual podría deberse a que no todos los explantes produjeron callo embriogénico, además de hacerlo en distintas proporciones, dependiendo del genotipo.

Además, se encontró una correlación positiva entre las variables relacionadas a la producción de callo embriogénico y la capacidad de regeneración. Al igual que en el estudio de Gandonou et al. (2005), la alta correlación observada indica que la producción de callo embriogénico constituye un buen índice de la capacidad de los explantes para regenerar plantas. Por otro lado, no hubo una correlación de la capacidad de regeneración con la de establecimiento. La ausencia de correlación entre estas variables indicaría que estas etapas son controladas por diferentes mecanismos (Gandonou et al., 2005).

#### **4.1.7- Aclimatación a las condiciones *ex vitro* y sobrevivencia en el campo**

Las plantas regeneradas *in vitro* se aclimataron con éxito en condiciones de invernáculo. Todos los genotipos presentaron una capacidad de aclimatación superior al 90%, tanto en bandejas como en macetas. Otros estudios también reportan aclimatación superior a 80% en distintos cultivares de caña de azúcar (Chen et al., 1988; Alcantara et al., 2014; Kaur y Kapoor, 2016; Nogueira et al., 2019). En los genotipos estudiados no fue necesaria una etapa de pre-aclimatación como proponen otros autores (Nogueira et al., 2019). La aclimatación en bandejas favoreció al crecimiento en grosor del tallo, mientras que en macetas favoreció al desarrollo de las hojas en longitud, esto último podría deberse a la búsqueda de mayor intensidad lumínica de las plantas dentro de la maceta. Por otro lado, el procedimiento de aclimatación en bandejas resulta más práctico cuando se deben manejar muchas plantas.

Luego de la aclimatación en invernáculo, las plantas fueron trasplantadas a campo, donde se observó un crecimiento vigoroso y saludable, con una supervivencia superior al 98%, al igual que otros estudios reportados en la revisión de Snyman et al. (2011).

Cabe destacar que, se observó una gran variabilidad en algunos atributos, principalmente en el número de tallos y diámetro del entrenudo, lo cual indicaría la manifestación de variación somaclonal.

Cuatro de los genotipos desarrollados por el PMGCA de INTA presentaron una respuesta *in vitro*, vía embriogénesis somática indirecta, conveniente para su uso en mutagénesis *in vitro*, garantizando un sistema de regeneración eficiente para obtener plantas mutantes. La información aquí descrita se puede utilizar como base para la optimización de protocolos de regeneración para otros cultivares de caña de azúcar de INTA. Estos resultados permitirán también la aplicación de otras técnicas de mejoramiento no tradicionales a este cultivo que impliquen esta ruta morfogénica de regeneración, tales como la transformación genética y edición génica.

#### **4.2- Tratamiento mutagénico *in vitro* en el genotipo INTA CP 98-828**

La mutagénesis puede incrementar la variación somaclonal inducida por cultivo *in vitro*, mejorando así la probabilidad de seleccionar plantas con atributos deseables (Suprasanna et al., 2011; Rutherford et al., 2014). El EMS es el mutágeno químico más utilizado para inducir mutaciones en plantas, debido a su capacidad para inducir altas frecuencias de mutaciones de punto sin causar anomalías letales a los cromosomas (Jankowicz-Cieslak y Till, 2016). En este sentido, hay estudios sobre el tratamiento de callos de caña de azúcar con EMS, seguido de protocolos de selección apropiados para la producción de plantas tolerantes a herbicidas (Koch et al., 2012), a estrés salino (Kenganal et al., 2008), a sequía (Khalil et al., 2018; Masoabi et al., 2018; Chaisan et al., 2019), resistentes a enfermedades (Mahlanza et al., 2013; Kona et al., 2019), así como con mejoras en caracteres agronómicos y de calidad (Gadakh et al., 2015).

La efectividad y eficiencia de cualquier experimento de mutagénesis inducida son el resultado directo de la elección de la dosis de mutágeno apropiada (Kodym et al., 2012). Por lo

tanto, antes de un tratamiento mutagénico se debe hacer una determinación preliminar de la dosis que originaría la mayor cantidad de mutaciones deseables, sin afectar el desarrollo normal de las plantas. Es importante tener en cuenta que la frecuencia de las mutaciones acumuladas puede ser distinta en diferentes genotipos y debido a variaciones en los procedimientos experimentales (Suprasanna et al., 2012; Jankowicz-Cieslak y Till, 2016). Además, se recomienda que las dosis informadas previamente se utilicen solo como dosis de referencia y que se realicen ensayos previos para determinar la dosis adecuada para el material a tratar en cada experimento (Suprasanna et al., 2012).

Otro factor a tener en cuenta en el diseño de los experimentos mutagénicos es que los mutágenos químicos son más efectivos cuando se aplican a las células en división, como en los callos, porque la probabilidad de reparación incorrecta de la mutación es mayor cuando las células se encuentran replicando su ADN (Koch et al., 2012). En este sentido, la presencia de 2,4-D durante el tratamiento promueve la división celular y contribuye a la supervivencia celular y al mantenimiento de la cantidad de embriones presentes en los callos de caña de azúcar (Munsamy et al., 2013), favoreciendo el objetivo de mutagenizar.

En este estudio se expusieron callos embriogénicos del genotipo INTA CP 98-828, previamente caracterizado en su respuesta al cultivo *in vitro*, a tratamientos de 0, 8, 16, 32 y 48 mM de EMS durante 3 h. El tratamiento 0 mM se incluyó como control y evidencia de la variación somaclonal. Las dosis de EMS aplicadas se escogieron en base a trabajos previos con EMS sobre callos de caña de azúcar (Koch et al., 2012; Sadat y Hoveize, 2012). Se evaluó el porcentaje de callos recuperados, el efecto de la dosis sobre la proliferación del callo embriogénico, así como la capacidad de regeneración de plantas y su aclimatación. Por último, se determinó la DL50 para definir el límite superior de la concentración de EMS para evaluar el efecto mutagénico sobre las plantas regeneradas.

#### **4.2.1- Efecto de la dosis de EMS sobre los callos embriogénicos de INTA CP 98-828**

En este estudio se observó que los tratamientos con EMS tuvieron un efecto sobre la proliferación del callo embriogénico, mostrando diferentes grados de sensibilidad hasta la necrosis total de los tejidos. La reducción de la proliferación de los callos en caña de azúcar por la exposición a EMS ha sido reportada en otros estudios (Koch et al., 2012; Masoabi et al.,

2018; Chaisan et al., 2019; Kona et al., 2019). Koch et al. (2012) trataron callos embriogénicos del cv. N12 con dosis de 0-96 mM de EMS durante 4 h y reportaron que la masa fresca del callo se inhibió a concentraciones superiores a 25 mM. Masoabi et al. (2018) en un experimento similar con dosis de 5-50 mM de EMS en el cv. NCo310, también observaron una inhibición de la proliferación de callo a partir de la dosis 25 mM. A diferencia de Koch et al. (2012) y Masoabi et al. (2018), la proliferación de los callos en el genotipo INTA CP 98-828 se vio afectada a partir de la dosis 16 mM y teniendo en cuenta el menor tiempo de exposición al mutágeno aplicado en este trabajo, el genotipo INTA CP 98-828 sería más sensible al EMS que los cultivares utilizados en estos estudios previos. Mahlanza et al. (2013) informaron que en el cv. NCo376 no se detectó necrosis de callos con dosis de 32 mM de EMS, mientras que en el presente estudio la misma dosis presentó callos necróticos descritos como de grado 1 en la escala utilizada. También Purnamaningsih y Hutami (2016) y Khalil et al. (2018) observaron diferencias en la sensibilidad de los callos de diferentes genotipos de caña de azúcar tratados con EMS.

#### **4.2.2- Efecto de la dosis de EMS sobre la regeneración de INTA CP 98-828**

Luego de 16 semanas de cultivo bajo condiciones de luz se obtuvieron plantas regeneradas, a partir de los sectores embriogénicos de los callos en todas las dosis evaluadas. La regeneración sufrió un retraso comparado con las 8-12 semanas que llevó el desarrollo completo de plantas en los ensayos de respuesta a la embriogénesis somática. Koch et al. (2010) también observaron que el tiempo de regeneración aumentó en los tratamientos con EMS. A pesar de este retraso en su desarrollo, la capacidad de regeneración siguiendo el protocolo de mutagénesis química por inmersión no se vio afectada en el tratamiento control 0 mM, donde la inmersión se realizó en medio líquido MS3 sin mutágeno. El número de plantas regeneradas fue similar al observado en el ensayo de respuesta a la embriogénesis somática para el genotipo INTA CP 98-828. Por lo tanto, el protocolo diseñado para los tratamientos mutagénicos no afectó el número de plantas obtenido al final del experimento.

En este trabajo la capacidad de regeneración no fue afectada con la dosis 8 mM de EMS respecto al control, pero se observó una disminución de plantas significativa a partir del tratamiento 16 mM. Mahlanza et al. (2013) observaron que el rendimiento de plantas no se vio

afectado por una concentración de 32 mM de EMS en el cv. NCo376, mientras que, en el cv. N12, Koch et al. (2012) encontraron diferencias significativas respecto al control a partir de la misma dosis. Por otro lado, Masoabi et al. (2018) reporta una reducción significativa del número de plantas a partir de 25 mM de EMS en el cv. NCo310. Por lo tanto, la capacidad de regeneración del genotipo INTA CP 98-828 también es más susceptible al tratamiento mutagénico que otros cultivares. Además, la reducción en el rendimiento de plantas puede deberse a la disminución en la producción viable de callo embriogénico (Koch et al., 2012).

En este estudio, se observó una baja frecuencia de plantas anormales, principalmente debido a deficiencia clorofílica. Las plantas albinas se presentaron con una frecuencia de 0,01 en las dosis 16 y 32 mM y en una frecuencia de 0,04 en la dosis de 48 mM de EMS. Masoabi et al. (2018) también observó la presencia de plantas fenotípicamente anormales en la dosis que afecta la capacidad de regeneración (25 mM) y Mahlanza et al. (2013) reportó una frecuencia de plantas anormales de 0,02, con variación en la longitud de raíces y deficiencias clorofílicas, en dosis de 32 mM.

Cabe destacar que el número de plantas regeneradas para dosis altas como 32 mM fue mayor a 1500 plantas. Por lo tanto, con esta capacidad de regeneración sería posible aplicar protocolos de selección *in vitro* con herbicidas, toxinas fúngicas o de estrés abiótico como los realizados en otros estudios (Koch et al., 2012; Masoabi et al., 2018; Chaisan et al., 2019; Mahlanza et al., 2019).

Si bien la capacidad de aclimatación en este estudio se vio afectada por la infección fúngica durante el trasplante a invernáculo, una vez superada la infección, se aclimataron más del 80% de las plantas recuperadas. En el estudio de Koch et al. (2012) el éxito de la aclimatación fue muy variable y no estuvo relacionado con la concentración de EMS, variando de 5-100%, mientras que el 96% de las plantas de control se aclimataron con éxito. Por el contrario, Sadat y Hoveize (2012) reportaron que todas las plantas regeneradas crecieron normalmente en condiciones de invernadero con un 91% de supervivencia.

#### 4.2.3- Dosis letal media (DL50)

Como se mencionó anteriormente, antes de iniciar un tratamiento mutágeno, el paso más importante es determinar la dosis efectiva de mutágeno, para lo cual es necesario estimar la DL50 sobre la población de plantas  $M_1$ , que resulta en una reducción del 50% de las plantas viables. Las investigaciones sobre mutágenos químicos demuestran que las dosis que inducen una letalidad del 25 al 50% (DL25- DL50) entre las plantas  $M_1$  darán como resultado las tasas de mutaciones más altas (Leitão, 2012) y en mutagénesis *in vitro* se recomienda que un tratamiento mutagénico óptimo permita una supervivencia del 40-60% de los callos (Wagih et al., 2004).

En este trabajo, se determinó una DL50 sobre la capacidad de regeneración de 31,68 mM de EMS con un intervalo de confianza del 95% de 29,59 - 33,77 mM, para un tiempo de exposición al mutágeno de 3 h. Con mutágenos químicos, a diferencia de los físicos, no suele haber una correlación directa entre los efectos letales y los efectos mutagénicos (Prina et al., 2010). Por lo general, se recomienda trabajar con dosis menores a la DL50 para tejidos en cultivo *in vitro* (Suprasanna et al., 2012). Por lo tanto, el dato de la DL50 sobre la capacidad de regeneración de plantas se empleó para definir el límite superior de la concentración de EMS adecuada para evaluar el efecto mutagénico sobre las plantas mutantes de INTA CP 98-828. Por consiguiente, se evaluaron fenotípicamente las dosis  $\leq 32$  mM de EMS.

Otros estudios informaron la concentración ideal y el tiempo de exposición a EMS para la producción de plantas de caña de azúcar tolerantes a estrés salino (40 mM durante 2.5 h), a estrés hídrico (16 mM durante 4 h) y resistentes a herbicidas (16 mM durante 4 h) en los cultivares Co86032, KK3 y N12, respectivamente (Kenganal et al., 2008; Koch et al., 2012; Chaisan et al., 2019). Estas concentraciones siempre se encuentran por debajo de la DL50 definida para estos cultivares.

Por otro lado, se determinó la DL50 sobre la capacidad de recuperación de los callos, para comprobar que en las dosis  $\leq 32$  mM se recupera más del 40-60% de los callos como sugiere Wagih et al. (2004), teniendo en cuenta que incluso si algunos callos pueden sobrevivir a dosis más altas, no pueden regenerarse. La DL50 para esta variable resultó 47,11 mM con un intervalo de confianza del 95% de 45,31 - 48,91 mM. Por lo tanto, las dosis de EMS  $\leq 32$  mM permiten una recuperación de callos mayor al 50%. Sadat y Hoveize (2012) observaron valores

comparables de DL50, 32.61 mM - 48.74 mM en tratamientos de 4 h con EMS en los cultivares CP 48-103 y CP 57-614.

Como era de esperar, las ecuaciones de regresión para ambas variables demostraron que el EMS tiene un efecto nocivo en las células vegetales a medida que se aumenta la concentración.

Si bien se reporta que el genotipo tiene una influencia sobre la dosis de EMS a utilizar sobre el cultivo *in vitro* para la inducción de mutaciones, las dosis  $\leq$  DL50 definidas en este trabajo para el genotipo INTA CP 98-828 se asemejan a las informadas en la bibliografía, variando más o menos el tiempo de exposición al mutágeno. Por lo tanto, los protocolos podrían extrapolarse a otros genotipos del PMGCA de INTA que presenten buena respuesta a la embriogénesis somática, la cual presentó un marcado comportamiento genotipo dependiente en este trabajo.

#### **4.3- Evaluación de la variabilidad generada por los tratamientos mutagénicos y el cultivo *in vitro***

Aunque plantas mutantes y/o somaclones de caña de azúcar han sido detectados exitosamente mediante técnicas moleculares como RAPD (Zambrano et al., 2003a; Khan et al., 2009; Mahmud et al., 2015), SSR (Sadat y Hoveize, 2012; Mahmud et al., 2016a; Khalil et al., 2018) o AFLP (Munsamy et al., 2013), la forma más conveniente de caracterización son las evaluaciones a campo, donde puede observarse una expresión estable de nuevos atributos durante varios ciclos de cultivo (Snyman et al., 2011; Suprasanna et al., 2012), ya que los nuevos caracteres pueden ser mantenidos a través de la propagación asexual en caña de azúcar (Sadat y Hovaize, 2012).

En este estudio se evaluaron fenotípicamente cuatro poblaciones de somaclones y/o plantas mutantes, para una exploración preliminar de la variación genética generada mediante el cultivo *in vitro* y la aplicación de distintas dosis de EMS sobre callos embriogénicos del cv. INTA CP 98-828. Estas poblaciones correspondieron a los tratamientos de variación somaclonal (0) y aquellos donde la dosis de EMS fue menor o igual a la DL50 estimada para la regeneración de plantas (8, 16 y 32 mM). En el mismo experimento se incluyeron clones

replicados del genotipo *wild type* o clon madre, que fueron utilizados como control y para la estimación independiente de la variabilidad ambiental incidente.

Se evaluaron diferentes caracteres que determinan el rendimiento cultural y sacarino en caña de azúcar. Si bien, el mutágeno químico EMS genera una alta tasa de mutaciones puntuales en el genoma, éstas podrían no expresarse fenotípicamente en estos caracteres complejos. Sin embargo, la necesidad de pasar por el cultivo *in vitro* para disminuir la frecuencia de quimeras genera variación somaclonal, la cual sí tiene una incidencia detectable sobre estos atributos, según estudios previos (Manchanda et al., 2018). Por lo tanto, es necesario evaluar si la combinación de mutágeno y cultivo *in vitro* genera cambios en estos caracteres sin un efecto en detrimento de los mismos.

La embriogénesis somática indirecta en caña de azúcar resulta en plantas que son muy variables en número cromosómico y características agronómicas (Heinz y Mee, 1969; Larkin y Scowcroft, 1981; Snyman et al., 2011). Las causas de la variación somaclonal son complejas: se reportaron reordenamientos cromosómicos, activación de transposones endógenos, modificaciones del contenido de ADN nuclear y cambios en el estado de metilación del ADN, y la aplicación de mutágenos puede ser un factor contribuyente (Suprasanna et al., 2011; Shu et al., 2012; Rutherford et al., 2014; Manchanda et al., 2018). En caña de azúcar, la poliploidía y el alto número de cromosomas del donante conducen a una mayor variabilidad debido a las mayores posibilidades de generar aneuploides, aberraciones cromosómicas, eventos de duplicación cromosómica y control complejo del ciclo celular, aunque una interacción entre las variaciones somaclonales y la redundancia genética dicta los resultados fenotípicos (Khan et al., 2019).

En un primer análisis de los estadísticos descriptivos de la población total, los coeficientes de variación demostraron que existe variabilidad fenotípica comparable a la de una población de progenies híbridas de caña de azúcar para algunos atributos. Por ejemplo, Sopena (2010) encontró un CV fenotípica de 15,40%, 7,80% y 5,80% en los caracteres PT, DT y LT, respectivamente, para la población total de 20 familias híbridas de caña de azúcar en etapa de planta individual (Famaillá, 1999). En el presente estudio los CV para los mismos caracteres culturales fueron aún superiores, 19,33%, 8,57% y 9,77%, respectivamente. Por otro lado, los CV fenotípica para los atributos de calidad °Bx, Pol%ca y RFE% fueron menores, 3,80%,

5,21% y 6,02%, respectivamente, a los del trabajo de Sopena (2010), 4,70%, 7,60% y 9,70% para los mismos caracteres, respectivamente.

En el análisis de los componentes de la varianza, se determinó que la variación dentro de los tratamientos explicó más del 80% de la variación total en todos los caracteres, a causa de las diferencias entre los genotipos dentro de los tratamientos con menores diferencias entre las expresiones medias. Se detectaron fuertes variaciones o dispersión en los tratamientos respecto de sus medias, con una considerable superposición de las expresiones individuales, que no permitieron poner de manifiesto diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, existieron diferencias entre las medias de los tratamientos con EMS y el tratamiento de variación somaclonal en la LT y en los caracteres de calidad fabril. Si bien la variación somaclonal presidió la variación en estos caracteres, la aplicación del mutágeno impuso un incremento en su expresión media. El tratamiento de 8 mM de EMS presentó una media mayor en el DT y PT con respecto a los otros tratamientos, sin embargo, la variación fenotípica para estos caracteres, en este tratamiento, estuvo explicada principalmente por variación ambiental.

Si bien los tratamientos mutagénicos y el tratamiento de variación somaclonal no presentaron diferencias en las medias poblacionales para la mayoría de los caracteres, a excepción de la LT y los atributos de calidad antes mencionados, se observaron diferencias significativas respecto al genotipo *wild type* en los caracteres NT, LT, DT y LE, °Bx, Pol%ca y RFE%.

Gadakh et al. (2015) también encontraron un incremento de la media en el NT y LT respecto al genotipo *wild type*, en tratamientos con EMS (DL50 para cv. Co 99004 y cv. Co 94012) y de variación somaclonal (tratamiento 0 de este estudio). Estos autores también reportan un incremento de la media de la LT en el tratamiento con EMS respecto a su tratamiento 0. Al igual que en el presente trabajo, se reporta una disminución significativa en la media del DT en los tratamientos con EMS, con respecto al *wild type*, pero no así en el tratamiento de variación somaclonal. Por otro lado, en los caracteres de calidad como °Bx y Pol%ca, Gadakh et al. (2015) reportan mayores valores de las expresiones medias en los tratamientos con EMS respecto al *wild type*, como se observó en este estudio. Dalvi et al. (2012) también informaron aumento de NT, LT, Pol%ca y °Bx en genotipos selectos tratados con EMS. Sobhakumari (2012), después de evaluar variantes somaclonales de caña de azúcar en el

campo durante tres años, concluyó que algunos rasgos son estables y pueden pasar de una generación clonal a la otra.

Estudios de mutagénesis *in vitro* con otros mutágenos químicos, encontraron genotipos mutantes resistentes a roya marrón con mayor LT y NT, y menor DT y Pol%ca con respecto al genotipo *wild type* (Oloriz et al., 2011) y genotipos con mayor NT, Pol%ca, contenido de fibra y menor DT (Munsamy et al., 2013).

La mayor capacidad de macollaje y la disminución en el diámetro de tallo son características recurrentes en caña de azúcar propagada por cultivo *in vitro*. El mayor número de tallos podría resultar en la producción de cañas más delgadas porque el diámetro está inversamente relacionado con el macollaje. Esta tendencia hacia la reducción uniforme del diámetro y mayor número de tallos también fue reportado en cañas transgénicas, donde se utiliza la misma ruta morfogénica de reproducción *in vitro* (Lakshmanan et al., 2006; Romero et al., 2019).

Como se confirma en este estudio, múltiples rasgos podrían ser alterados simultáneamente (Rutherford et al., 2014) y como expresan Suprasanna y Jain (2017), un solo mutante inducido puede tener varios rasgos deseables, para resistencia a enfermedades, alto rendimiento, calidad, arquitectura de la planta y tolerancia al estrés abiótico.

#### **4.3.1- Análisis de la variación dentro de los tratamientos y parámetros genéticos**

En el caso de cultivos de propagación asexual, como la caña de azúcar, los genotipos completos de los individuos se transmiten de una generación a la siguiente, por consiguiente, la  $V_G$  resulta suficientemente informativa y se utiliza GDG para evaluar el potencial fitotécnico de una población (Mariotti y Collavino, 2014). Cabe destacar que algunas variantes fenotípicas pueden no estar asociadas a efectos genéticos estables, denominados efectos “C”, que tienden a desaparecer en el curso de algunas generaciones de reproducción asexual, por lo tanto, los GDG calculados se pueden interpretar como un límite superior o máximo del GDG para cada carácter (Mariotti, 1991; Mariotti y Collavino, 2014).

Aunque no se observaron diferencias en las expresiones medias de los tratamientos en muchos caracteres, si se observó diferencias en los  $CV_G$  y los valores de GDG. En la mayoría

de los caracteres evaluados se observó generación de variabilidad genética debida a la combinación del cultivo *in vitro* y la aplicación de EMS. La variación somaclonal explicó una parte importante de la variación genética en la mayoría de los caracteres culturales y calidad. Sin embargo, la aplicación del mutágeno al cultivo *in vitro* incrementó la variación genética en todos los caracteres culturales, principalmente en la dosis 32 mM. Otros estudios también reportan variabilidad fenotípica en estos caracteres, en plantas obtenidas por mutagénesis *in vitro* con EMS en caña de azúcar (Khairwal et al., 1984; Dalvi et al., 2012; Gadakh et al., 2015; Mahmud et al., 2016b) y por variación somaclonal (Liu y Chen, 1978; Hoy et al., 2003; Doule et al., 2008; Singh et al., 2008; Sobhakumari, 2012; Khan et al., 2019), aunque no se informa el porcentaje de variación genética que explica esta variación en el caso de tratamientos mutagénicos.

Si bien el método de genotipos sin repetición es una manera sencilla, aunque rudimentaria, de estimar la varianza genética en una población de un carácter cuantitativo (Mariotti, 1991), esta técnica permitió estimar qué dosis de EMS sería la apropiada para utilizar en un programa de mejoramiento basada en generación de variabilidad por mutagénesis *in vitro*. Aunque los tratamientos mutagénicos no se diferenciaron en sus expresiones medias fenotípicas, se detectaron diferencias en el porcentaje de varianza genética que explicaron la variabilidad fenotípica observada. Al igual que sucede con familias obtenidas por cruzamientos sexuales, para poblaciones con medias similares y para un carácter determinado, el que resulte con varianzas más elevadas, tiene más probabilidades de generar genotipos superiores (Sopena, 2010).

En este estudio, se consideró que la dosis 32 mM de EMS sería la más adecuada para generar variabilidad genética, con potencial fitotécnico para selección en un programa de mejoramiento genético basado en mutagénesis *in vitro*. De acuerdo con Stanfield (1971), los caracteres se consideraron de heredabilidad alta cuando ésta es mayor a 0,50, de heredabilidad media entre 0,20 y 0,50, y de heredabilidad baja si es menor a 0,20. En el caso de la dosis 32 mM de EMS, la heredabilidad fue alta para el NT, PT, NE, LE, Pol%ca y RFE%, mientras que LT, DT y °Bx presentaron una heredabilidad media.

La dosis 32 mM de EMS permitió recuperar alrededor del 50% de las plantas regeneradas *in vitro*, encontrándose dentro del intervalo de la DL50 (29,59 a 33,77 mM) para la regeneración de plantas; presentó mayor variabilidad genética entre las dosis de EMS, sin un efecto en

detrimiento de los caracteres culturales y calidad, incluso con incrementos de la media poblacional respecto al genotipo *wild type* en algunos atributos; y podría presentar una mayor frecuencia de mutaciones puntuales para generar mutantes tolerantes a estrés biótico y abiótico, con la posibilidad de seleccionar genotipos superiores en los caracteres culturales y de calidad.

Cabe destacar que este trabajo presenta una estimación preliminar de la variabilidad genética generada por mutagénesis *in vitro*, siendo necesaria una evaluación de la expresión estable de estos atributos en los posteriores ciclos de propagación vegetativa. Un futuro experimento con repeticiones de cada genotipo permitiría reflejar un comportamiento repetible entre ciclos de cultivo y aumentar el grado de confiabilidad de estos resultados, ya que, algunas de estas diferencias tempranas podrían atribuirse al estrés *in vitro*, que puede dar lugar a variación epigenética por metilación del ADN (Snyman et al., 2011).

## CONCLUSIONES

❖ Los genotipos de INTA presentaron una respuesta diferencial a la embriogénesis somática indirecta, corroborando la dependencia del genotipo de esta ruta morfogénica.

❖ Los cultivares INTA CP 98-828, INTA NA 89-686, INTA NA 91-209 y L91-281 mostraron capacidad para formar callos embriogénicos y regenerar plantas. Estos genotipos también mostraron una alta adaptación tanto en condiciones de invernáculo como de campo, garantizando un sistema de regeneración eficiente para la aplicación de mutagénesis *in vitro*.

❖ Considerando todas las etapas de cultivo *in vitro*, el cultivar INTA CP 98-828 manifestó la mejor respuesta a la embriogénesis somática indirecta, siendo el más adecuado para ensayos de mutagénesis *in vitro*. El protocolo MS3/MS1 fue el mejor para la inducción de callos en este genotipo y el cultivo en bandeja fue el mejor método de aclimatación.

❖ El mutágeno EMS afectó principalmente la proliferación de callos manteniendo la capacidad embriogénica y de regeneración de plantas del cultivar INTA CP 98-828.

❖ La DL50 sobre la capacidad de regeneración fue 31,68 mM de EMS y la DL50 para la recuperación de callos resultó 47,11 mM. Estos valores fueron similares a los reportados en otros cultivares de caña de azúcar, por lo que los protocolos podrían utilizarse como base para la aplicación en otros genotipos del PMGCA de INTA.

❖ Las concentraciones de EMS inferiores a 32 mM resultaron óptimas para regenerar suficiente cantidad de plantas en el genotipo INTA CP 98-828, con un rendimiento adecuado para realizar evaluaciones fenotípicas a campo.

❖ La variación somaclonal, debida a la reproducción *in vitro*, explicó una parte importante de la variación genética en la mayoría de los caracteres culturales y de calidad fabril.

❖ La aplicación del mutágeno EMS al cultivo *in vitro* incrementó la variación genética en todos los caracteres culturales.

❖ El incremento de la variación genética en los caracteres culturales por las dosis de EMS no fue en detrimento de las expresiones medias poblacionales con respecto al genotipo *wild type*, a excepción del DT.

❖ Se observó un incremento de la media poblacional en los tratamientos respecto al genotipo *wild type* en los parámetros NT, LT, LE, °Bx, Pol%ca y RFE%.

❖ La dosis 32 mM de EMS permitió recuperar alrededor del 50% de las plantas regeneradas *in vitro*, presentó mayor variabilidad genética entre las dosis de EMS, con valores medios a altos de heredabilidad, sin un efecto en detrimento de los caracteres culturales y calidad, incluso con incrementos de la media poblacional respecto al genotipo *wild type* en algunos atributos.

Los resultados de este estudio respaldan la hipótesis planteada de que es posible generar variación genética al exponer cultivos de callos embriogénicos al agente mutagénico EMS, seguido de la regeneración de las plantas mediante embriogénesis somática, en genotipos de caña de azúcar de INTA.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, Smiullah, Khan FA, Rameez I, Raza MM, Aslam R, et al.. 2013. Detection of somaclonal variation in micropropagated plants of sugarcane and SCMV screening through ELISA. *Journal of Agricultural Science* 5:199–208.
- Acevedo A, Tejedor MT, Erazzú LE, Cabada S and Sopena R. 2017. Pedigree comparison highlights genetic similarities and potential industrial values of sugarcane cultivars. *Euphytica* 213–221.
- Acreche MM, Saez JV and Chalco Vera J. 2015. Physiological bases of genetic gains in sugarcane yield in Argentina. *Field Crops Research* 175:80–86.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M and Nichterlein K. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135:187–204.
- Alcantara GB, Dibax R, de Oliveira RA, Bessalho Filho JC and Daros E. 2014. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum. Agronomy* 36:63–72.
- Ali A, Naz S and Iqbal J. 2007a. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pakistan Journal of Botany* 39:1961–1977.
- Ali A, Naz S, Sarwar Alam S and Iqbal J. 2007b. *In vitro* induced mutation for screening of red rot (*Colletotrichum falcatum*) resistance in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pakistan Journal of Botany* 39:1979–1994.
- Barbosa MHP and da Silveira LCI. 2015. Breeding Program and Cultivar Recommendations. In F. Santos, A. Borém, and C. Caldas, editors. *Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol*. Elsevier, Viçosa. 241–255 p.
- de Bem Oliveira I, Nunes R, Mattiello L, Barros-Ribeiro S, de Souza IP, Coelho ASG and Collevatti RG. 2019. Research and partnership in studies of sugarcane using molecular markers: a scientometric approach. *Scientometrics* 119:335–355.
- Benedetti P. 2018. Primer relevamiento del cultivo de caña de azúcar de la República Argentina a partir de imágenes satelitales para la campaña 2018. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-informe\\_relevamiento\\_del\\_cultivo\\_de\\_cana\\_de\\_azucar\\_en\\_argentina\\_durante\\_el\\_2018\\_a\\_partir\\_de\\_imagenes\\_satelitales\\_1\\_0.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-informe_relevamiento_del_cultivo_de_cana_de_azucar_en_argentina_durante_el_2018_a_partir_de_imagenes_satelitales_1_0.pdf).
- Benedetti PE and Sopena RA. 2020. Caña de azúcar: 260.800 son las hectáreas cultivadas en la provincia. Disponible en: [https://inta.gob.ar/noticias/cana-de-azucar-260800-son-las-hectareas-cultivadas-en-la-provincia?fbclid=IwAR1xIbOh2HQrfcEf\\_IYPSTAXtdC9rME7RuMSG1g-P\\_esrWmzopaJko2DWEg](https://inta.gob.ar/noticias/cana-de-azucar-260800-son-las-hectareas-cultivadas-en-la-provincia?fbclid=IwAR1xIbOh2HQrfcEf_IYPSTAXtdC9rME7RuMSG1g-P_esrWmzopaJko2DWEg)
- Bibi S, Khan IA, Khatri A, Yasmin S, Seema N, Afghan S and Arain MA. 2010. Screening of mutated population of sugarcane through RAPD. *Pakistan Journal of Botany* 42:3765–

3773.

- Bonnett GD. 2013. Developmental Stages (Phenology). In P. H. Moore and F. C. Botha, editors. *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 35–53 p.
- Bremer G. 1961. Problems in breeding and cytology of sugarcane. *Euphytica* 10:59–78.
- Bull TA and Glasziout KT. 1963. The evolutionary significance of sugar accumulation in *Saccharum*. *Australian Journal of Biological Sciences* 16:737–742.
- Burnquist WL, Redshaw K and Gilmour RF. 2010. Evaluating sugarcane R&D performance: Evaluation of three breeding programs. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 27:1–15.
- Centro azucarero argentino. 2019. <http://centroazucarero.com.ar/>
- Chaisan T, Weksanthia N and Wannarat W. 2019. EMS mutagenesis and *in vitro* evaluation for development of new sugarcane clones with tolerance to water deficits. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 30:489–492.
- Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HMC, Arruda P, Bespalkok Filho JC, Burnquist WL, Creste S, et al. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology* 4:62–89.
- Chen WH, Davey MR, Power JB and Cocking EC. 1988. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. *Journal of Experimental Botany* 39:251–261.
- Crawley MJ. 2013. The R Book. Second. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 942 pp.
- D'Hont A. 2005. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenetic and Genome Research* 109:27–33.
- D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N and Glaszmann JC. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* 250:405–413.
- D'Hont A, Paulet F and Glaszmann JC. 2002. Oligoclonal interspecific origin of “North Indian” and “Chinese” sugarcanes. *Chromosome Research* 10:253–262.
- Dal-Bianco M, Carneiro MS, Hotta CT, Chapola RG, Hoffmann HP, Garcia AAF and Souza GM. 2012. Sugarcane improvement: How far can we go?. *Current Opinion in Biotechnology* 23:265–270.
- Dalvi SG, Vasekar VC, Yadav A, Tawar PN, Dixit GB, Prasad DT and Deshmukh RB. 2012. Screening of Promising Sugarcane Somaclones for Agronomic Traits, and Smut Resistance Using PCR Amplification of Inter Transcribed Region (ITS) of *Sporisorium scitaminae*. *Sugar Tech* 14:68–75.
- Daniels J and Roach BT. 1987. Taxonomy and evolution. In D. Heinz, editor. *Sugarcane Improvement through Breeding*. Elsevier B.V., Amsterdam. 7–84 p.
- Dibax R, de Alcântara GB, Filho JCB, Machado MP, de Oliveira Y and da Silva ALL. 2011.

- Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710 from somatic embryos and acclimatization. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2:32–37.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M and Robledo CW. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat , FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Di Rienzo JA, Guzmán AW and Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 7:129–142.
- Doule RB, Kavar PG, Devarumath RM and Nerkar YS. 2008. Field performance and RAPD analysis for assessment of genetic variation in sugarcane somaclones. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 68:301–306.
- Errabii T, Gandonou CB, Essalmani H, Abrini J, Idaomar M and Skali-Senhaji N. 2006. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of Biotechnology* 5:1488–1493.
- FAOSTAT. 2019. <http://www.fao.org/statistics/en/>
- Felipe A, Sopena R and Erazu L. 2016. RED CAÑA: Red de evaluación de cultivares de caña de azúcar (*Saccharum* spp . híbrido) en Argentina. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-red\\_cana\\_red\\_de\\_evaluacion\\_de\\_cultivares\\_de\\_cana\\_de\\_azucar\\_saccharum\\_spp\\_hibrido\\_en\\_argentina.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-red_cana_red_de_evaluacion_de_cultivares_de_cana_de_azucar_saccharum_spp_hibrido_en_argentina.pdf)
- Figueiredo P. 2010. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In L. L. Dinardo-Miranda, A. C. Machado de Vasconcelos, and A. G. Landell, editors. *Cana-de-açúcar*. Instituto Agrônomo, Campinas. 31–41 p.
- Fontana P, Felipe A, Sopena R, Di Pauli V and Erazzú L. 2016. Caracterización de germoplasma del Banco Activo de Caña de azúcar de INTA por calidad fabril y tolerancia a frío. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/caracterizacion-de-germoplasma-del-banco-activo-de-cana-de-azucar-de-inta-por-calidad-fabril-y-tolerancia-a-frio>
- Fuchs M, González V, Rea R, Zambrano A, De Sousa-Vieira O, Díaz E, Gutiérrez Z and Castro L. 2005. Mejoramiento de la caña de azúcar mediante la inducción de mutaciones en cultivo de callos. *Agronomía Tropical* 55:133–149.
- Gadakh SS, Patel and Patil DU. 2015. Evaluation of Sugarcane (*Saccharum* Spp. Complex) Mutants for Yield, Yield Contributing Traits and Quality Parameters. *International Journal of Advanced Biology Research* 5:220–228.
- Gandonou C, Errabii T, Abrini J, Idaomar M, Chibi F and Skali Senhaji N. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African Journal of Biotechnology* 4:1250–1255.
- Gandonou CB, Errabii T, Abrini J, Idaomar M and Senhaji NS. 2006. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:9–16.

- Garsmeur O, Droc G, Antonise R, Grimwood J, Potier B, Aitken K, et al. 2018. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. *Nature Communications* 9:1–10.
- Geier T. 2012. Chimeras: Properties and Dissociation in Vegetatively Propagated Plants. In Q. Y. Shu, B. P. Forster, and H. Nakagawa, editors. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Viena. 191–201 p.
- Guiderdoni E and Demarly Y. 1988. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14:71–88.
- Haccius B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28:74–81.
- Heinz DJ and Mee GWP. 1969. Plant Differentiation from Callus Tissue of *Saccharum* Species. *Crop Science* 9:346–348.
- Ho WJ and Vasil IK. 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.
- Hoy JW, Bischoff KP, Milligan SB and Gravois KA. 2003. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. *Euphytica* 129:237–240.
- Instituto de Promoción del Azúcar y Alcohol de Tucumán. 2020. Zafra 2019/2020. <http://www.ipaat.gov.ar/index.php/informes-de-produccion/>
- Irvine JE. 1999. *Saccharum* species as horticultural classes. *Theoretical and Applied Genetics* 98:186–194.
- Irvine JE, Fitch M and Moore PH. 1983. The induction of callus in sugarcane tissue cultures by selected chemicals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2:141–149.
- Jackson PA. 2005. Breeding for improved sugar content in sugarcane. *Field Crops Research* 92:277–290.
- Jankowicz-Cieslak J and Till BJ. 2016. Chemical Mutagenesis of Seed and Vegetatively Propagated Plants Using EMS. *Current Protocols in Plant Biology* 1:617–635.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295–302.
- Kaur R and Kapoor M. 2016. Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Sugarcane. *Sugar Tech* 18:93–99.
- Kenganal M, Hanchinal RR and Nadaf HL. 2008. Ethyl methanesulfonate (EMS) induced mutation and selection for salt tolerance in sugarcane *in vitro*. *Indian Journal Plant Physiology* 13:405–410.
- Khairwal IS, Singh S, Paroda RS and Taneja AD. 1984. Induced mutations in sugarcane - Effects of physical and chemical mutagens on commercial cane sugar and other quality

- traits. *Proceedings of the Indian National Science Academy* B50:505–511.
- Khalil F, Naiyan X, Tayyab M and Pinghua C. 2018. Screening of EMS-induced drought-tolerant sugarcane mutants employing physiological, molecular and enzymatic approaches. *Agronomy* 8:226.
- Khan IA, Bibi S, Yasmin S, Khatri A, Seema N and Afghan S. 2010. Genetic variability in mutated population of sugarcane clone NIA-98 through molecular markers (RAPD and TRAP). *Pakistan Journal of Botany* 42:605–614.
- Khan IA, Dahot MU and Khatri A. 2007. Study of genetic variability in sugarcane induced through mutation breeding. *Pakistan Journal of Botany* 39:1489–1501.
- Khan IA, Dahot MU, Seema N, Bibi S and Khatri A. 2008. Genetic variability in plantlets derived from callus culture in sugarcane. *Pakistan Journal of Botany* 40:547–564.
- Khan IA, Dahot MU, Seema N, Yasmin S, Bibi S, Raza S and Khatri A. 2009. Genetic variability in sugarcane plantlets developed through *in vitro* mutagenesis. *Pakistan Journal of Botany* 41:153–166.
- Khan MT, Seema N, Khan IA, and Yasmine S. 2019. Exploitation of Somaclonal variations for improvement of sugar recovery in sugarcane. *Sugar industry* 144:194–203.
- Khan SJ, Khan H ullah, Khan DR, Iqbal MM and Zafar Y. 2000. Development of sugarcane mutants through *in vitro* mutagenesis. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3:1123–1125.
- Koch AC, Snyman SJ, Ramgareeb RS and Watt M.P. 2010. An *in vitro* induced mutagenesis protocol for the production of sugarcane tolerant to imidazolinone herbicides. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 27:1–5.
- Koch AC, Ramgareeb S, Rutherford RS, Snyman SJ and Watt MP. 2012. An *in vitro* mutagenesis protocol for the production of sugarcane tolerant to the herbicide imazapyr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 48:417–427.
- Kodym A, Afzaa R, Forstera BP, Ukaid Y, Nakagawa H and Mba C. 2012. Methodology for Physical and Chemical Mutagenic Treatments. In Q. Y. Shu, B. P. Forster, and H. Nakagawa, editors. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Vienna. 169–208 p.
- Kona P, Kumar MH, Reddy KHP, Hemalatha TM, Reddy DM, Reddy NPE and Latha P. 2019. Regeneration and evaluation of somaclones of sugarcane variety Co86032 for yellow leaf disease resistance and yield traits. *Journal of Biosciences* 44:44–29.
- Kumar P, Agarwal A, Tiwari AK, Lal M and Jabri MRA. 2012. Possibilities of Development of Red Rot Resistance in Sugarcane Through Somaclonal Variation. *Sugar Tech* 14:192–194.
- Lakshmanan P. 2006. Invited review addendum: Somatic embryogenesis in sugarcane - An addendum to the invited review “Sugarcane Biotechnology: The Challenges and Opportunities”. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42:201–205.

- Lakshmanan P, Geijskes RJ, Aitken KS, Grof CLP, Bonnett GD and Smith GR. 2005. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41:345–363.
- Lakshmanan P, Geijskes RJ, Wang L, Elliott A, Grof CPL, Berding N and Smith GR. 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Reports* 25:1007–1015.
- Larkin PJ and Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197–214.
- Larkin PJ and Scowcroft WR. 1983. Somacinal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2:111–121.
- Leitão JM. 2012. Chemical Mutagenesis. In Q. Y. Shu, B. P. Forster, and H. Nakagawa, editors. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Viena. 135–158 p.
- Liu MC. 1993. Factors Affecting Induction, Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Callus from Cultured Immature Inflorescences of Sugarcane. *Journal of Plant Physiology* 141:714–720.
- Liu MC and Chen WH. 1978. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. II. Performance and yield potential of callus derived lines. *Euphytica* 27:273–282.
- Mahlanza T, Rutherford RS, Snyman SJ and Watt MP. 2013. *In vitro* generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. *Plant Cell Reports* 32:249–262.
- Mahlanza T, Rutherford RS, Snyman SJ and Watt MP. 2019. Methylglyoxal-induced enhancement of somatic embryogenesis and associated metabolic changes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136:279–287.
- Mahmud K, Nasiruddin K, Hossain M and Hassan L. 2016a. Screening sugarcane somaclones and their parent varieties against red rot (*Colletotrichum falcatum*) and assessment of Variability by RAPD and SSR markers. *SAARC Journal of Agriculture* 13:173–182.
- Mahmud K, Nasiruddin KM, Hossain MA and Hassan L. 2015. Characterization of induced sugarcane somaclones and their sources varieties using Random Amplified Polymorphic DNA. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 25:223–229.
- Mahmud K, Nasiruddin KM, Hossain MA and Hassan L. 2016b. Development of mutants in sugarcane through callus culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 26:123–130.
- Majid MA, Shamsuzzaman KM, Howlader MAR and Islam MM. 2001. Development of sugarcane mutants with resistance to red rot, water-logging and delayed or non-flowering through induced mutations. *Proceedings of a final Research Coordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA*. Shanghai. 31–43.
- Manchanda P, Kaur A and Gosal SS. 2018. Somaclonal variation for sugarcane improvement.

*Biotechnologies of Crop Improvement* 1:299–326.

- Marcano AK, Guevara PM, Oropeza M and de García E. 2002. Improvement of somatic embryogenesis in sugarcane Venezuelan cultivars. *Acta Científica Venezolana* 53:251–257.
- Mariotti JA. 1991. Variabilidad y selección de poblaciones generadas *in vitro*. In W. M. Roca and L. A. Mroginski, editors. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali. 361–373 p.
- Mariotti JA. 2015. Mejoramiento genético de la caña de azúcar: breve reseña, logros y perspectivas. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales* 5:7–12.
- Mariotti JA and Collavino NG. 2014. Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires. 325 pp.
- Mariotti JA, Sopena RA, Ullivarri E, Rago AM, Terán CH, Collavino NG, Pocovi MI, and Simón GE. 2006. Breeding and sustainable crop management as the basis for competitiveness of sugar cane production in Argentina. *Sugar Tech* 8:217–223.
- Masoabi M, Lloyd J, Kossmann J and van der Vyver C. 2018. Ethyl methanesulfonate mutagenesis and *in vitro* polyethylene glycol selection for drought tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Sugar Tech* 20:50–59.
- McCullagh P, and Nelder JA. 1989. Generalized linear models. Second Ed. Chapman and Hall, London. 511 pp.
- Ministerio de Hacienda. 2018. Informes de cadenas de valor - Azucarera. Disponible en: [https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/2018/SSPMicro\\_Cadenas\\_de\\_valor\\_Trigo.pdf](https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/2018/SSPMicro_Cadenas_de_valor_Trigo.pdf).
- Mittal P, Devi R and Gosal SS. 2016. Effect of genotypes and activated charcoal on high frequency *in vitro* plant regeneration in sugarcane. *Indian Journal of Biotechnology* 15:261–265.
- Mittal P, Gosal SS, Senger A and Kumar P. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15:257–265.
- Moore PH and Berding N. 2013. Flowering. In P. H. Moore and F. C. Botha, editors. *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 379–410 p.
- Moore PH, Paterson AH and Tew T. 2013. Sugarcane: The Crop, the Plant, and Domestication. In P. H. Moore and F. C. Botha, editors. *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 1–17 p.
- Mozambani AE, Pinto A de S, Segato SV and Mattiuz CFM. 2006. História e morfologia da cana-de-açúcar. In S. Segato, A. de S. Pinto, E. Jendiroba, and J. C. M. de Nóbrega, editors. *Atualização em produção de Cana-de-Açúcar*. Piracicaba. 11–18 p.
- Munsamy A, Rutherford RS, Snyman SJ and Watt MP. 2013. 5-Azacytidine as a tool to induce somaclonal variants with useful traits in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant Biotechnology*

*Reports* 7:489–502.

- Murashige T and Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.
- Mustafa G and Khan MS. 2016. Differential Role of Indolebutyric Acid in Sugarcane Root Development. *Sugar Tech* 18:55–60.
- Nadar HM, Soeprapto S, Heinz DJ and Ladd SL. 1978. Fine Structure of Sugarcane (*Saccharum* sp.) Callus and the Role of Auxin in Embryogenesis. *Crop Science* 18:210–216.
- Niaz F and Quraishi A. 2002. Studies on Somatic Embryogenesis in Sugarcane. *Journal of Biological Sciences* 2:67–69.
- Nikam AA, Devarumath RM, Ahuja A, Babu H, Shitole MG and Suprasanna P. 2015. Radiation-induced *in vitro* mutagenesis system for salt tolerance and other agronomic characters in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Crop Journal* 3:46–56.
- Nogueira GF, Luis ZG, Pasqual M and Scherwinski-Pereira JE. 2019. High-efficiency somatic embryogenesis of a broad range of Brazilian *Saccharum* spp. hybrids (sugarcane) varieties using explants from previously established *in vitro* plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 55:26–35.
- OECD/FAO. 2018. Sugar. Pages 139–276 *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027 - Sugar*. Disponible en: [https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/data/oecd-agriculture-statistics\\_agr-data-en](https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/data/oecd-agriculture-statistics_agr-data-en).
- Oloriz MI, Gil V, Rojas L, Veitía N, Höfte M and Jiménez E. 2011. Selection and characterisation of sugarcane mutants with improved resistance to brown rust obtained by induced mutation. *Crop and Pasture Science* 62:1037–1044.
- Oloriz MI, Gil V, Rojas L, Portal O, Izquierdo Y, Jiménez E and Höfte M. 2012. Sugarcane genes differentially expressed in response to *Puccinia melanocephala* infection: Identification and transcript profiling. *Plant Cell Reports* 31:955–969.
- Patade VY, Bhargava S and Suprasanna P. 2012. Transcript expression profiling of stress responsive genes in response to short-term salt or PEG stress in sugarcane leaves. *Molecular Biology Reports* 39:3311–3318.
- Patade VY, Suprasanna P, Bapat VA and Kulkarni UG. 2006. Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane. *BARC Newsletter*:244–257.
- Perera MF, Arias ME, Costilla D, Luque AC, García MB, Romero CD, et al. 2012. Genetic diversity assessment and genotype identification in sugarcane based on DNA markers and morphological traits. *Euphytica* 185:491–510.
- Piperidis G, Piperidis N and D’Hont A. 2010. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Molecular Genetics and Genomics* 284:65–73.

- Pocoví MI, Collavino NG, Locatelli FM, Pacheco MG, Díaz D, Ríos RD and Mariotti JA. 2008. Assessing genetic variability of subtropical hybrid sugarcane (*Saccharum* spp.) materials using isozymes and AFLP. *Sugar Cane International* 26:6–11.
- Prina A, Landau A, Pacheco MG and Hopp E. 2010. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, and L. Mroginski, editors. *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones INTA. 217–228 p.
- Purnamaningsih R and Hutami S. 2016. Increasing Al-tolerance of sugarcane using ethyl methane sulphonate and *in vitro* selection in the low pH media. *HAYATI Journal of Biosciences* 23:1–6.
- Rae AL, Martinelli AP and Dornelas MC. 2013. Anatomy and morphology. In P. H. Moore and F. C. Botha, editors. *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 19–34 p.
- Rao JT, Srinivasan KV and Alexander KC. 1966. A red rot resistant mutant of sugarcane induced by gamma irradiation. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 64:224–230.
- Raza S, Qamarunnisa S, Jamil I, Naqvi B, Azhar A and Qureshi JA. 2014. Screening of sugarcane somaclones of variety BL4 for agronomic characteristics. *Pakistan Journal of Botany* 46:1531–1535.
- Romero ER, Scandaliaris J, Digonzelli PA, Leggio Neme MF, Giardina JA, Fernandez de Ullivarri J, et al. 2009. La caña de azúcar. Características y ecofisiología. In E. R. Romero, P. A. Digonzelli, and J. Scandaliaris, editors. *Manual del Cañero*. First edition. EEAOC, Tucumán. 23–3 p.
- Romero M, Robredo C, Uchino D, Easdale C, Cornejo FY, Palacio C and Serino G. 2019. Agronomic and compositional characterization of a glyphosate-tolerant transgenic event derived from sugarcane cultivar NA05-2019. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 30:435–441.
- Rose RJ and Song Y. 2017. Somatic Embryogenesis. In T. Brian, B. G. Murray, and D. J. Murphy, editors. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Second. Elsevier, Pontypridd, UK. 474–479 p.
- Roy M, Hossain M, Biswas A, Islam R and Sarker SR. 2010. Induction and Evaluation of Somaclonal Variation in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var. Isd-16. *Philippine Journal Crop Science*. 1:117–123.
- Rutherford RS, Snyman SJ and Watt MP. 2014. *In vitro* studies on somaclonal variation and induced mutagenesis: Progress and prospects in sugarcane (*Saccharum* spp.) - a review. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 89:1–16.
- Sabatier D, Martiné JF, Chiroleu F, Roussel C, Letourmy P, van Antwerpen R, et al. 2015. Optimization of sugarcane farming as a multipurpose crop for energy and food production. *GCB Bioenergy* 7:40–56.
- Sadat S and Hoveize MS. 2012. Mutation induction using ethyl methanesulfonate (EMS) in

- regenerated plantlets of two varieties of sugarcane CP48-103 and CP57-614. *African Journal of Agricultural Research* 7:1282–1288.
- Salles Scarpari M and Gomes EF de B. 2010. Anatomia e Botânica. In L. L. Dinardo-Miranda, A. C. Machado de Vasconcelos, and A. G. Landell, editors. *Cana-de-açúcar*. Instituto Agronômico, Piracicaba. 47–56 p.
- Sandhu KS, Singh R and Suprasanna P. 2019. Radiation-induced mutants with increased cane number in sugarcane variety CoJ 85. *Journal of Crop Improvement* 33:187–201.
- Santana N. 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* species) *in vitro*. *Cultivos tropicales* 4:567–575.
- Secretaría de Gobierno de Energía. 2019. Producción y Ventas de Bioetanol. Disponible en: <http://datos.minem.gob.ar/dataset/estadisticas-de-biodiesel-y-bioetanol>.
- Sega GA. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 134:113–142.
- Sengar AS, Thind KS, Kumar B, Pallavi M and Gosal SS. 2009. *In vitro* selection at cellular level for red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Growth Regulation* 58:201–209.
- Shahid MTH, Khan FA, Saeed A, Aslam M and Rasul F. 2012. Development of somaclones in sugarcane genotype BF-162 and assessment of variability by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeats (SSR) markers in selected red rot resistant somaclones. *African Journal of Biotechnology* 11:3502–3513.
- Shu QY, Forster BP, and Nakagawa H. 2012. Plant mutation breeding and biotechnology. Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Viena. 589 pp.
- Singh G, Sandhu SK, Meeta M, Singh K, Gill R and Gosal SS. 2008. *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. *Euphytica* 160:35–47.
- Singh RB, Singh B and Singh RK. 2019. Identification of elite Indian sugarcane varieties through DNA fingerprinting using genic microsatellite markers. *Vegetos* 32:547–555.
- Snyman SJ. 2002. Development of a transformation system for sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in South Africa using herbicide resistance as a model system. Thesis. University of Stellenbosch, South Africa. 166 pp.
- Snyman SJ. 2004. Sugarcane Transformation. In I. S. Curtis, editor. *Transgenic Crops of the World - Essential Protocols*. Kluwer Academic Publishers. 103–114 p.
- Snyman SJ, Baker C, Hockett BI, McFarlane SA, Van Antwerpen T, Berry S, et al. 2008. South African Sugarcane Research Institute: Embracing biotechnology for crop improvement research. *Sugar Tech* 10:1–13.
- Snyman SJ, Meyer GM, Carson DL and Botha FC. 1996. Establishment of embryogenic callus and transient gene expression in selected sugarcane varieties. *South African Journal of*

*Botany* 62:151–154.

- Snyman SJ, Meyer GM, Koch AC, Banasiak M and Watt MP. 2011. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 47:234–249.
- Snyman SJ, Meyer GM, Richards JM, Haricharan N, Ramgareeb S and Hockett BI. 2006. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: Effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cell Reports* 25:1016–1023.
- Sobhakumari VP. 2012. Assessment of somaclonal variation in sugarcane. *African Journal of Biotechnology* 11:(87)15303-15309.
- Solangi KS, Qureshi ST, Khan IA and Raza S. 2016. Establishment of *in vitro* callus in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties influenced by different auxins. *African Journal of Biotechnology* 15:1541–1550.
- Sopena R. 2010. La Selección Familiar como Estrategia en el Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar *Saccharum* spp. Thesis. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. 87 pp.
- Sopena RA. 2008. Mejoramiento Genético de Caña de Azúcar. *Idia XXI Cultivos Industriales Año VIII*:119–122.
- De Sousa-Vieira O and Milligan SB. 1999. Intrarow plant spacing and family x environment interaction effects on sugarcane family evaluation. *Crop Science* 39:358–364.
- Stadler LJ. 1930. Some genitic effects of X-rays in plants. *Journal of Heredity* 21:3–20.
- Stanfield WD. 1971. Genética. Teoría y 440 problemas resueltos. Segunda ed. Serie Schaum, McGraw-Hill, México. 405 pp.
- Sughra MG, Altaf SA, Rafique RM, Muhammad MS, Rind Balouch SN and Umar DM. 2014. *In vitro* regenerability of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties through shoot tip culture. *Pakistan Journal of Biotechnology* 11:13–23.
- Suprasanna P and Jain SM. 2017. Mutant resources and mutagenomics in crop plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29:651–657.
- Suprasanna P, Jain SM, Ochatt SJ, Kulkarni VM and Predieri S. 2012. Applications of *in vitro* Techniques in Mutation Breeding of Vegetatively Propagated Crops. In Q. Y. Shu, B. P. Forster, and H. Nakagawa, editors. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Vienna. 371–385 p.
- Suprasanna P, Patade VY, Desai NS, Devarumath RM, Kawar PG, Pagariya MC, Ganapathi A, Manickavasagam M and Babu KH. 2011. Biotechnological Developments in Sugarcane Improvement: An Overview. *Sugar Tech* 13:322–335.
- Taylor PWJ, Ko HL, Adkins SW, Rathus C and Birch RG. 1992. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp.

- hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:69–78.
- USDA. 2019. Sugar Annual - Argentina. *Global Agricultural Information Network*. Disponible en: <https://www.fas.usda.gov/databases/global-agricultural-information-network-gain>
- Verma I, Roopendra K, Sharma A, Chandra A, and Kamal A. 2019. Expression analysis of genes associated with sucrose accumulation and its effect on source–sink relationship in high sucrose accumulating early maturing sugarcane variety. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25:207–220.
- Wagih ME, Ala A and Musa Y. 2004. Regeneration and evaluation of sugarcane somaclonal variants for drought tolerance. *Sugar Tech* 6:35–40.
- Wang H, Xiao, N, Wang Y, Guo J and Zhang J. 2020a. Establishment of a qualitative PCR assay for the detection of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in sugarcane. *Crop Protection* 130:105053.
- Wang K, Deng Q, Chen J and Shen W. 2019. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and visual detection of Sugarcane streak mosaic virus in sugarcane. *Crop Protection* 119:38–45.
- Wang Z, Pan Y, Luo J, You Q, Xu L, Zhang H and Que Y. 2020b. SSR-Based Genetic Identity of Sugarcane Clones and its Potential Application in Breeding and Variety Extension. *Sugar Tech* 22:367–378.
- Wekesa RK. 2017. Evaluation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and naphthalene acetic acid concentration on callogenesis, somaclonal variation and sugarcane mosaic virus elimination in sugarcane. Thesis. Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology. Kenia. 205 pp.
- You Q, Yang X, Peng Z, Islam MS, Sood S, Luo Z, Comstock J, Xu L and Wang J. 2019. Development of an Axiom Sugarcane100K SNP array for genetic map construction and QTL identification. *Theoretical and Applied Genetics* 132:2829–2845.
- Zambrano AY, Demey JR, Fuchs M, González V, Rea R, De Sousa O and Gutiérrez Z. 2003a. Selection of sugarcane plants resistant to SCMV. *Plant Science* 165:221–225.
- Zambrano AY, Demey JR and González V. 2003b. *In vitro* selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:365–373.
- Zhang J, Zhang X, Tang H, Zhang Q, Hua X, Ma X, et al. 2018. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L.. *Nature Genetics* 50:1565–1573.

## ANEXO I: Análisis estadístico

### ❖ Respuesta diferencial de los genotipos de caña de azúcar de INTA a la embriogénesis somática

#### AI.1- Capacidad de establecimiento (ES)

##### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
binomial	logit	Alcanzada	1,00

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				95	115,49	
genotipo	5	36,35		90	79,14	<0,0001

genotipo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
INTA NA 91-209	5,441,00	1,00	4,3E-03A		
INTA CP 98-828	4,710,71	0,99	0,01A		
aNA 85-1602	4,710,71	0,99	0,01A		
L 91-281	4,300,58	0,99	0,01A		
FAM 81-820	2,790,29	0,94	0,02	B	
INTA NA 89-686	2,500,25	0,92	0,02	B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Sobredispersión: 1,09

#### AI.2- Porcentaje de callo Tipo 3 (PT3)

##### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
gaussian	identity	Alcanzada	0,01

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				76	51,88	
genotipo	4	50,74		72	1,14	<0,0001
protocolo	1	0,02		71	1,11	0,1809
genotipo:protocolo	4	0,33		67	0,79	<0,0001

genotipo	protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
INTA CP 98-828	MS3	4,000,04	4,00	0,04	A	
INTA CP 98-828	MS3/MS1	4,000,04	4,00	0,04	A	
NA 85-1602	MS3/MS1	3,960,04	3,96	0,04	A	
NA 85-1602	MS3	3,960,04	3,96	0,04	A	
INTA NA 89-686	MS3/MS1	3,260,04	3,26	0,04	B	
INTA NA 89-686	MS3	3,250,04	3,25	0,04	B	
INTA NA 91-209	MS3	3,160,04	3,16	0,04	B	
INTA NA 91-209	MS3/MS1	3,030,04	3,03	0,04	C	
L 91-281	MS3/MS1	1,930,04	1,93	0,04	D	
L 91-281	MS3	1,660,04	1,66	0,04	E	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Media PT377	0,00	0,10	0,97		0,5028

### AI.3- Capacidad embriogénica (EM)

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
binomial	logit	Alcanzada	1,00

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				76		313,11	
Genotipo	4	222,59		72		90,51	<0,0001
Protocolo	1	3,78		71		86,74	0,0519
Genotipo:Protocolo	4	11,12		67		75,62	0,0252

Genotipo	Protocolo	PredLin	E.E.	Media	E.E.
INTA CP 98-828	MS3/MS1	3,170,51	0,96	0,02	A
aNA 85-1602	MS3	3,160,51	0,96	0,02	A
INTA NA 89-686	MS3	2,940,59	0,95	0,03	A
INTA NA 89-686	MS3/MS1	2,390,37	0,92	0,03	A
aNA 85-1602	MS3/MS1	2,260,33	0,91	0,03	A
INTA NA 91-209	MS3/MS1	1,860,28	0,86	0,03	B
INTA CP 98-828	MS3	1,700,27	0,85	0,04	B
INTA NA 91-209	MS3	1,350,23	0,79	0,04	B
L 91-281	MS3/MS1	-0,180,20	0,46	0,05	C
L 91-281	MS3	-0,570,20	0,36	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Sobredispersión: 0,98

### AI.4- Capacidad de regeneración (RG)

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
Negative Binomial(19.581)	log	Alcanzada	1,00

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				69		335,57	
Genotipo	4	257,90		65		77,67	<0,0001
Protocolo	1	1,01		64		76,66	0,3151
Genotipo:Protocolo	4	2,82		60		73,84	0,5887

Genotipo	PredLin	E.E.	Media	E.E.
aNA 85-1602	5,280,06	196,15	11,62	A
INTA CP 98-828	5,170,06	176,06	11,21	A
INTA NA 91-209	4,920,07	136,96	9,21	B
INTA NA 89-686	4,830,07	124,82	8,89	B
L 91-281	3,850,07	47,11	3,28	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Sobredispersión: 1,08

## AI.5- Análisis de Correlación

### Coefficientes de correlación

Correlación de Spearman

Variable (1)	Variable (2)	n	Spearman	p-valor
EM	RG	69	0.79	<0.0001
EM	PT3	69	0.59	<0.0001
EM	ES	69	0.06	0.5981
RG	PT3	69	0.77	<0.0001
RG	ES	69	0.02	0.8967
PT3	ES	69	0.01	0.9115

## AI.6- Capacidad de aclimatación (AC)

### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
binomial	logit	Alcanzada	1,00

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				137		139,97	
Genotipo	4	1,66		133		138,31	0,7972
Protocolo	1	0,01		132		138,30	0,9107
Procedim	1	5,97		131		132,32	0,0145
Genotipo:Protocolo	4	1,76		127		130,56	0,7792
Genotipo:Procedim	4	4,74		123		125,82	0,3154
Protocolo:Procedim	1	1,60		122		124,22	0,2054
Genotipo:Protocolo:Procedim.	4	1,51		118		122,71	0,8252

Procedures	PredLin	E.E. Media	E.E.
Tray	3,470,25	0,97	0,01 A
Pot	2,800,15	0,94	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Sobredispersión: 0,98

## AI.7- Supervivencia en el campo (SC)

### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
binomial	logit	Alcanzada	1,00

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				49		37,00	
Genotipos	4	1,57		45		35,43	0,8140
Procedimiento	1	1,03		44		34,40	0,3101
Genotipos:Procedim..	4	8,75		40		25,65	0,0677

Sobredispersión: 0,78

## ❖ Mutagénesis *in vitro* en el genotipo INTA CP 98-828

### AI.8- Capacidad de recuperación de callos (RCmut)

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
binomial	logit	Alcanzada	1,00

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				89	483,14	
Dosis	4	405,25		85	77,89	<0,0001

Dosis	PredLin	E.E.	Media	E.E.
0	22,452890	0,94	1,00	5,2E-07A
16	22,322956	0,00	1,00	6,0E-07A
8	3,89	0,41	0,98	0,01A
32	1,89	0,17	0,87	0,02A
48	-0,12	0,13	0,47	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Sobredispersión: 1,75

### AI.9- Sensibilidad de los callos (Smut)

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
gaussian	identity	Alcanzada	0,03

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				88	116,99	
Dosis	4	114,31		84	2,68	<0,0001

Dosis	PredLin	E.E.	Media	E.E.
0	4,990,04	4,99	0,04	A
8	4,960,04	4,96	0,04	A
16	4,530,04	4,53	0,04	B
32	3,020,04	3,02	0,04	C
48	2,160,04	2,16	0,04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Media Santana	89	0,00	0,17	0,96	0,1343

### AI.10- Capacidad de regeneración (RGmut)

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
Negative Binomial(41.5498)	log	Alcanzada	1,00

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df Resid.	Dev	Pr(>Chi)
--	----	----------	--------	-----------	-----	----------

NULL			59	531,14	
Dosis.EMS	4	457,56	55	73,57	<0,0001

Dosis.EMS	PredLin	E.E. Media	E.E.	
0	5,320,05	204,55	10,49	A
8	5,320,05	203,92	9,63	A
16	5,040,05	155,08	7,82	B
32	4,630,05	102,87	4,88	C
48	3,650,07	38,33	2,86	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Sobredispersión: 1,08

## AI.11- Regresión capacidad de recuperación (RCmut)

### Regresión logística

Distribución: Binomial

Función de enlace: Logit

Frecuencias: total callos

Variable dependiente: callos embriogénicos

La variable dependiente contiene el número de éxitos

Número de observaciones: 1299

Observaciones faltantes: 10

Iteraciones: 8 (max=20)

Tolerancia: 1E-9 (0,000000000)

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald	LI (95%)	Wald	LS (95%)	Wald	Chi <sup>2</sup>	p-valor
Constante	5,93	0,10	376,76		307,63		461,41		3289,77	<0,0001
Dosis	-0,132,5E-03		0,88		0,88		0,89		2605,25	<0,0001

	Valor	gl
Log Likelihood	-325,271297	
Deviance	92,021297	
Escala (estimada)	0,27	

### Pruebas de hipótesis secuenciales

F.V.	gl	-2[L0-L1]	p-valor
Dosis	1	391,12	<0,0001

Matriz de covarianzas

	Constante	Dosis
Constante	0,01	-2,5E-04
Dosis	-2,5E-04	6,1E-06

## AI.12- Regresión capacidad de regeneración (RGmut)

### Análisis de regresión lineal

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
n° de plantas	60	0,86	0,86	614,42	555,77	562,06

### Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	Cp	Mallows	VIF
const	217,66	4,96	207,74	227,58	43,92	<0,0001			
Dosis EMS	-3,65	0,19	-4,03	-3,27	-19,02	<0,0001	361,70	1,00	

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	208920,75	1	208920,75	361,70	<0,0001
Dosis EMS	208920,75	1	208920,75	361,70	<0,0001
Error	33501,59	58	577,61		
Total	242422,33	59			

## ❖ Evaluación de la variabilidad generada por los tratamientos mutagénicos y el cultivo *in vitro*

### AI.13- Estadísticos descriptivos (invernáculo)

#### Medidas resumen

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
0	N° de macollos	50	0.72	1.03	143.19	0.00	3.00
0	Altura	50	114.40	39.85	34.84	20.00	190.00
0	Diámetro basal del tallo	50	5.94	1.91	32.12	1.12	9.05
8	N° de macollos	50	0.60	0.86	142.86	0.00	2.00
8	Altura	50	107.80	29.76	27.60	11.00	169.00
8	Diámetro basal del tallo	50	5.19	1.33	25.57	2.20	7.36
16	N° de macollos	50	0.72	1.05	145.91	0.00	4.00
16	Altura	50	103.52	33.28	32.15	25.00	160.00
16	Diámetro basal del tallo	50	4.65	1.52	32.59	1.39	7.32
32	N° de macollos	50	1.20	1.20	99.60	0.00	4.00
32	Altura	50	124.26	32.52	26.17	50.00	177.00
32	Diámetro basal del tallo	50	5.39	1.37	25.38	1.63	7.80

### AI.14- Comparación de medias entre la población tratada y el testigo

#### Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Variable	Grupo 1	Grupo 2	Media(1)	Media(2)	W	p(2 colas)
NT	t	wt	10.39	7.78	3262.50	<0.0001
LT	t	wt	226.21	218.26	4894.50	0.0033

#### Prueba T para muestras Independientes

Variable	Grupo 1	Grupo 2	Media(1)	Media(2)	pHom	Var T	p-valor prueba
DT	{t}	{wt}	20.65	21.56	0.1693	-3.33	0.0005 UnilatIzq
LE	{t}	{wt}	14.03	12.39	0.0050	9.85	<0.0001 UnilatDer
PT	{T}	{WT}	0.83	0.80	0.0043	1.11	0.2738 Bilateral
NE	{T}	{WT}	15.60	15.64	0.0087	-0.16	0.8742 Bilateral

#### Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Variable	Grupo 1	Grupo 2	Media(1)	Media(2)	W	p(2 colas)
°Bx	t	wt	20.08	19.77	1129.50	0.0059
Pol%ca	t	wt	14.58	14.35	1166.50	0.0117

RFE%	t	wt	11.07	10.88	1226.50	0.0315
------	---	----	-------	-------	---------	--------

## AI.15- ANOVA y comparación de medias

### Número de tallos (NT)

#### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
NT	200	0.02	0.01	23.76

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28.68	3	9.56	1.57	0.1984
Tratamiento	28.68	3	9.56	1.57	0.1984
Error	1182.38	196	6.09		
Total	1211.06	199			

#### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
NT	250	0.18	0.17	23.82

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	300.38	4	75.09	13.61	<0.0001
Tratamiento	300.38	4	75.09	13.61	<0.0001
Error	1340.96	245	5.52		
Total	1641.34	249			

##### Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.9628

Error: 5.5184 gl: 245

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
WT	7.78	50	0.33	A
8	9.75	48	0.34	B
16	10.40	50	0.33	B
32	10.68	50	0.33	B
0	10.70	50	0.33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Longitud del tallo (LT)

#### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LT	200	0.09	0.07	9.40

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8468.42	3	2822.816.25	0.0005	
Tratamiento	8468.42	3	2822.816.25	0.0005	
Error	87678.67	196	451.95		
Total	96147.09	199			

❖ **Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias**

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LT	250	0.10	0.08	9.05

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10992.77	4	2748.196.66	<0.0001	
Tratamiento	10992.77	4	2748.196.66	<0.0001	
Error	100332.29	245	412.89		
Total	111325.06	249			

**Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=8.3278**

Error: 412.8901 gl: 245

Tratamiento	Medias	n	E.E.
0	215.34	50	2.87 A
WT	218.26	50	2.87 A
16	227.26	50	2.87 B
8	230.56	48	2.93 B
32	231.86	50	2.87 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Diámetro de tallo medio (DT)

❖ **Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT**

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
DT	200	0.06	0.05	8.35

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	39.58	3	13.19	4.43	0.0049
Tratamiento	39.58	3	13.19	4.43	0.0049
Error	577.67	196	2.98		
Total	617.25	199			

❖ **Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias**

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
DT	250	0.10	0.08	8.07

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	72.32	4	18.08	6.39	0.0001
Tratamiento	72.32	4	18.08	6.39	0.0001

Error	687.77	245	2.83
Total	760.09	249	

---

**Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.6895**

Error: 2.8303 gl: 245

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
32	20.24	50	0.24	A
0	20.47	50	0.24	A
16	20.53	50	0.24	A
8	21.42	48	0.24	B
WT	21.56	50	0.24	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Peso fresco de tallo individual (PT)

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PT	100	0.15	0.12	18.12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.38	3	0.13	5.55	0.0015
Tratamiento	0.38	3	0.13	5.55	0.0015
Error	2.18	96	0.02		
Total	2.56	99			

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PT	125	0.14	0.11	17.16

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.39	4	0.10	4.87	0.0011
Tratamiento	0.39	4	0.10	4.87	0.0011
Error	2.35	120	0.02		
Total	2.75	124			

**Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.0842**

Error: 0.0201 gl: 120

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
0	0.77	25	0.03	A
16	0.79	25	0.03	A
WT	0.80	22	0.03	A
32	0.83	25	0.03	A
8	0.93	25	0.03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Número de entrenados (NE)

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
NE	100	0.07	0.04	9.95

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16.90	3	5.63	2.34	0.0785
Tratamiento	16.90	3	5.63	2.34	0.0785
Error	231.42	96	2.41		
Total	248.32	99			

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
NE	125	0.06	0.03	9.33

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16.93	4	4.23	2.00	0.0993
Tratamiento	16.93	4	4.23	2.00	0.0993
Error	254.38	120	2.12		
Total	271.31	124			

## Longitud de entrenado (LE)

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LE	200	0.03	0.02	9.58

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12.69	3	4.23	2.34	0.0746
Tratamiento	12.69	3	4.23	2.34	0.0746
Error	350.72	196	1.81		
Total	363.42	199			

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LE	250	0.23	0.22	9.32

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	120.21	4	30.05	18.45	<0.0001
Tratamiento	120.21	4	30.05	18.45	<0.0001

Error	395.84	245	1.63
Total	516.05	249	

**Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.5231**

Error: 1.6290 gl: 245

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
WT	12.39	50	0.18	A
16	13.73	50	0.18	B
32	13.85	50	0.18	B
0	14.25	50	0.18	B
8	14.32	48	0.18	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Contenido de sólidos solubles en jugo (°Bx)

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
°Bx	100	0.15	0.12	3.56

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8.66	3	2.89	5.65	0.0013
Dosis	8.66	3	2.89	5.65	0.0013
Error	49.03	96	0.51		
Total	57.69	99			

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
°Bx	125	0.16	0.14	3.35

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10.54	4	2.64	5.85	0.0002
Dosis	10.54	4	2.64	5.85	0.0002
Error	54.07	120	0.45		
Total	64.61	124			

**Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.3904**

Error: 0.4506 gl: 120

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
0	19.61	25	0.13	A
WT	19.77	25	0.13	A
16	20.07	25	0.13	B
8	20.22	25	0.13	B
32	20.40	25	0.13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Pol por ciento en caña (Pol%ca)

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pol%ca	100	0.12	0.10	4.95

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.05	3	2.35	4.51	0.0053
Dosis	7.05	3	2.35	4.51	0.0053
Error	50.02	96	0.52		
Total	57.07	99			

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pol%ca	125	0,13	0,10	4,63

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,18	4	2,04	4,51	0,0020
Tratamiento	8,18	4	2,04	4,51	0,0020
Error	54,35	120	0,45		
Total	62,53	124			

#### Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.3914

Error: 0.4529 gl: 120

Tratamiento Medias n E.E.

0	14,15	25	0,13	A
WT	14,35	25	0,13	A
16	14,64	25	0,13	B
8	14,70	25	0,13	B
32	14,86	25	0,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Rendimiento Fabril Estimado (RFE%)

### ❖ Análisis de la varianza de los tratamientos sin el testigo WT

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RFE%	100	0.11	0.08	5.76

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4.90	3	1.63	4.02	0.0097
Dosis	4.90	3	1.63	4.02	0.0097
Error	38.97	96	0.41		
Total	43.87	99			

❖ **Análisis de la varianza de los tratamientos con el testigo WT: Comparación de medias**

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RFE%	125	0,12	0,09	5,40

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,59	4	1,40	3,94	0,0048
Tratamiento	5,59	4	1,40	3,94	0,0048
Error	42,50	120	0,35		
Total	48,09	124			

**Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.3461**

Error: 0.3542 gl: 120

Tratamiento	Medias	n	E.E.
0	10,70	25	0,12 A
WT	10,88	25	0,12 A
16	11,12	25	0,12 B
8	11,15	25	0,12 B
32	11,29	25	0,12 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## ANEXO II: Información complementaria

**AII.1:** Medias y valores máximos y mínimos estimados para los tratamientos y el testigo, en los caracteres culturales.

	<b>Carácter</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>E.E.</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Caracteres culturales</b>	Número de tallos NT	0	10,70	0,32	5	16
		8	9,75	0,31	5	14
		16	10,40	0,30	6	15
		32	10,68	0,45	3	18
		WT	7,78	0,25	5	12
	Longitud del tallo LT (cm)	0	215,34	2,99	161,00	263,00
		8	230,56	3,19	165,00	268,00
		16	227,26	2,91	171,00	268,00
		32	231,86	3,01	152,00	263,00
		WT	218,26	2,27	181,00	255,00
	Diámetro de tallo medio DT (mm)	0	20,47	0,22	16,64	24,72
		8	21,42	0,23	17,51	24,04
		16	20,53	0,27	16,31	25,46
		32	20,24	0,26	15,78	24,21
		WT	21,56	0,21	17,28	26,38
	Peso fresco de tallo individual PT (kg)	0	0,77	0,03	0,58	1,12
8		0,93	0,02	0,72	1,15	
16		0,79	0,03	0,37	1,16	
32		0,83	0,03	0,44	1,11	
WT		0,80	0,02	0,70	1,03	
Número de entrenudos NE	0	16,04	0,21	14,20	18,20	
	8	15,93	0,31	13,20	18,80	
	16	15,42	0,32	11,60	17,80	
	32	15,02	0,38	12,00	18,60	
	WT	15,64	0,20	13,40	17,60	
Longitud de entrenudo LE (cm)	0	14,25	0,17	12,10	16,80	
	8	14,32	0,19	11,00	16,90	
	16	13,73	0,18	10,20	15,80	
	32	13,85	0,21	10,50	17,20	
	WT	12,39	0,14	10,40	14,20	

**AII.2:** Parámetros fenotípicos y genéticos estimados para los tratamientos en los caracteres culturales.

Caracteres culturales	Carácter	Tratamiento	V <sub>P</sub>	V <sub>Ei</sub>	V <sub>G</sub>	CV <sub>P</sub> (%)	CV <sub>G</sub> (%)	GDG
	Caracteres culturales	Número de tallos NT	0	4,97	1,68	3,29	20,84	16,96
8			4,56	2,02	2,54	21,90	16,35	0,56
16			4,48	1,77	2,71	20,35	15,82	0,60
32			9,82	1,68	8,14	29,34	26,71	0,83
WT			3,17*	-	-	22,88*	-	-
Longitud del tallo LT (cm)		0	436,90	259,98	176,92	9,71	6,18	0,40
		8	477,91	226,79	251,12	9,48	6,87	0,53
		16	414,91	233,42	181,49	8,96	5,93	0,44
		32	442,96	224,25	218,71	9,08	6,38	0,49
		WT	253,07*	-	-	7,29*	-	-
Diámetro de tallo medio DT (mm)		0	2,43	2,44	0,00	7,62	0,00	0,00
		8	2,44	2,23	0,21	7,29	2,15	0,09
		16	3,52	2,43	1,09	9,14	5,09	0,31
		32	3,27	2,50	0,77	8,93	4,35	0,24
		WT	2,20*	-	-	6,88*	-	-
Peso fresco de tallo individual PT (kg)		0	0,02	0,01	0,01	18,37	12,46	0,46
		8	0,01	0,01	0,0026	10,75	5,48	0,26
		16	0,03	0,01	0,02	21,92	17,79	0,66
		32	0,02	0,01	0,01	17,04	12,47	0,54
		WT	0,01*	-	-	12,50*	-	-
Número de entrenudos NE	0	1,09	0,87	0,22	6,51	2,89	0,20	
	8	2,26	0,89	1,37	9,44	7,36	0,61	
	16	2,50	0,95	1,55	10,25	8,08	0,62	
	32	3,41	1,00	2,41	12,29	10,34	0,71	
	WT	0,92*	-	-	6,13*	-	-	
Longitud de entrenudo LE (cm)	0	1,49	0,68	0,81	8,57	6,31	0,54	
	8	1,70	0,67	1,03	9,11	7,07	0,60	
	16	1,65	0,73	0,92	9,36	6,97	0,56	
	32	2,25	0,72	1,53	10,83	8,93	0,68	
	WT	0,90*	-	-	7,66*	-	-	

V<sub>P</sub>, V<sub>Ei</sub> y V<sub>G</sub>: varianzas fenotípica, ambiental corregida y genética, CV<sub>P</sub> y CV<sub>G</sub>: coeficientes de variación fenotípica y genética, GDG: Grado de determinación genética.

\*La V<sub>P</sub> del tratamiento WT se consideró como la V<sub>E</sub> (varianza ambiental) y CV<sub>P</sub> para el tratamiento WT representa el CV<sub>E</sub> (coeficiente de variación ambiental).

**AII.3:** Medias y valores máximos y mínimos estimados para los tratamientos y el testigo, en los caracteres de calidad fabril.

	<b>Carácter</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>E.E.</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Caracteres de calidad fabril</b>	Contenido de sólidos solubles en jugo (°Bx)	0	19,61	0,20	17,10	21,50
		8	20,22	0,13	18,70	21,50
		16	20,07	0,11	18,80	20,90
		32	20,40	0,12	18,40	21,20
		WT	19,77	0,09	18,90	20,50
	Pol por ciento en caña (Pol%ca)	0	14,15	0,20	11,78	15,96
		8	14,70	0,12	13,54	15,85
		16	14,64	0,12	13,54	15,64
		32	14,86	0,12	12,92	15,64
		WT	14,35	0,08	13,35	15,09
	Rendimiento Fabril Estimado (RFE%)	0	10,70	0,18	8,70	12,29
		8	11,15	0,10	10,14	12,11
		16	11,12	0,11	10,14	12,18
		32	11,29	0,11	9,64	11,98
		WT	10,88	0,08	9,99	11,52

**AII.4:** Parámetros fenotípicos y genéticos estimados para los tratamientos en los caracteres de calidad fabril.

	<b>Carácter</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>V<sub>P</sub></b>	<b>V<sub>Ei</sub></b>	<b>V<sub>G</sub></b>	<b>CV<sub>P</sub>(%)</b>	<b>CV<sub>G</sub>(%)</b>	<b>GDG</b>
<b>Caracteres de calidad fabril</b>	Contenido de sólidos solubles en jugo (°Bx)	0	0,92	0,20	0,72	4,89	4,32	0,78
		8	0,39	0,19	0,20	3,09	2,21	0,51
		16	0,31	0,19	0,12	2,77	1,70	0,37
		32	0,34	0,19	0,15	2,86	1,91	0,45
		WT	0,20*	-	-	2,26*	-	-
	Pol por ciento en caña (Pol%ca)	0	0,96	0,17	0,79	6,92	6,26	0,82
		8	0,32	0,16	0,16	3,85	2,70	0,49
		16	0,37	0,16	0,21	4,15	3,11	0,56
		32	0,35	0,16	0,19	3,98	2,94	0,55
		WT	0,17*	-	-	2,87*	-	-
	Rendimiento Fabril Estimado (RFE%)	0	0,74	0,14	0,60	8,04	7,21	0,80
		8	0,23	0,13	0,10	4,30	2,79	0,42
		16	0,31	0,13	0,18	5,01	3,77	0,57
		32	0,28	0,13	0,15	4,69	3,43	0,54
		WT	0,14*	-	-	3,44*	-	-

V<sub>P</sub>, V<sub>Ei</sub> y V<sub>G</sub>: varianzas fenotípica, ambiental corregida y genética, CV<sub>P</sub> y CV<sub>G</sub>: coeficientes de variación fenotípica y genética, GDG: Grado de determinación genética.

\*La V<sub>P</sub> del tratamiento WT se consideró como la V<sub>E</sub> (varianza ambiental) y CV<sub>P</sub> para el tratamiento WT representa el CV<sub>E</sub> (coeficiente de variación ambiental).



**2020**

Eric  
Barn