



# Contenidos

---

<b>El Proyecto Vitroplantas: su concepción, sus inicios y su impacto en la Agroindustria de la caña de Azúcar</b>	<b>03</b>
<b>Producción de caña semilla de alta calidad (Proyecto Vitroplantas): logros y desafíos</b>	<b>07</b>
<b>La producción de caña semilla de alta calidad comienza en el laboratorio</b>	<b>13</b>
<b>Etapa de aclimatación y crianza de vitroplantas de caña de azúcar en invernáculo</b>	<b>21</b>
<b>Manejo y producción de caña semilla de alta calidad en el semillero Básico de la EEAOC durante las campañas 2001-2009</b>	<b>27</b>
<b>Evolución y situación actual de los semilleros Registrados y Certificados</b>	<b>33</b>
<b>Enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en Tucumán</b>	<b>41</b>
<b>Diagnóstico de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en el Laboratorio de la Sección Fitopatología de la EEAOC</b>	<b>49</b>
<b>Evolución del estado sanitario de los semilleros Básico y Registrados provenientes de caña semilla micropropagada en la provincia de Tucumán</b>	<b>55</b>
<b>Glosario</b>	<b>63</b>
<b>Vitroplantas Project: production of high quality seedcane</b>	<b>67</b>

---

# El Proyecto Vitroplantas: su concepción, sus inicios y su impacto en la Agroindustria de la caña de Azúcar

Ing. Agr. Jorge Scandaliaris

## La década del 90' en Tucumán

La desregulación de la actividad azucarera en Argentina impuesta por el gobierno nacional en el año 1.992, trajo como consecuencia directa una notable reducción de los precios del azúcar en el mercado interno.

Tal disminución, estimada en una caída de alrededor del 50% de los valores normales de la década anterior, desató una profunda crisis en el sector azucarero que solo podía resolverse con incrementos en los rendimientos culturales, mejora de calidad de la materia prima y drástica reducción en los costos de las diferentes operaciones, para que el sistema productivo de la caña de azúcar recuperara condiciones razonables de rentabilidad, y siguiera operando en la provincia y en la región.

La crisis fue de tal gravedad, que salvo excepciones, los ingenios de Argentina tuvieron que sufrir procesos de cambio de dueños y el número de productores cañeros de la Provincia de Tucumán se redujo de 12 a 5 mil en pocos años. Eran tiempos de precios de quebranto del azúcar que solo algunos pocos productores, que utilizaban una alta tecnología, los podían soportar sin caer en la pérdida de capital. Bajo estas condiciones los actores de la agroindustria vivían una etapa de desaliento generalizado.

Recuperar el sector azucarero, requería de una profunda transformación en el manejo del sistema productivo, en el que los cambios más importantes se orientaban a la incorporación de nuevas tecnologías que permitieran crecer significativamente en productividad.

Para alcanzar este gran objetivo había que mecanizar las labores con un parque de maquinaria que fuera de la más alta eficiencia, innovar la producción de caña desde su etapa de plantación para lograr cañaverales de mayor capacidad productiva, modernizar la cosecha y el transporte, e introducir modificaciones a las fábricas para hacerlas más eficientes y así acompañar el proceso de transformación.

En este escenario de profunda necesidad de reconversión, se hicieron con gran esfuerzo grandes innovaciones tecnológicas en cosecha, transporte,

control de malezas, plantación, fertilización, maduradores químicos, variedades, etc., todo lo cual requería de un proceso de transferencia de las tecnologías para llegar a la gran masa de productores que ávidamente buscaban una salida para alcanzar significativas reducciones en sus costos de producción.

Las mejoras adoptadas por el sector, generaron incrementos anuales por rendimientos de azúcar por ha, del orden del 3,22%, lo que sumado a los menores costos de labores y de producción, definieron un cambio trascendente en la productividad y la rentabilidad de la agroindustria.

Sin embargo, había una gran distancia en términos de productividad, entre los diferentes productores, por lo que se requería un proceso de transferencia efectiva que llegara a la totalidad de los cañeros.

Para consolidar este proceso de reconversión se pensó a partir de 1997, en incorporar semilla saneada obtenida a partir de las técnicas de cultivos de meristemas y micropropagación, como forma de disminuir la incidencia de algunas enfermedades que estaban ampliamente difundidas en la región y que eran barreras que limitaban la capacidad productiva de los cañaverales. Se quería así sumar una nueva alternativa tecnológica para seguir un proceso de mejoras iniciado unos años atrás. Además, el sistema de semilleros en la provincia debía realizarse de manera tal que actuara como irradiación de tecnología a los cañeros de la provincia.

## Como nace la idea de las vitroplantas

En la segunda mitad de la década del '90 varias zonas azucareras del mundo como Cuba, EEUU, Brasil, Colombia, entre otras, comienzan a implementar en escala comercial el uso de las técnicas de cultivos de meristemas y micropropagación en algunos casos involucrando organismos de ciencia y técnica, y en otros casos, con la participación activa del sector privado como en los EE.UU.

Para no quedar al margen de la posibilidad de aprovechar las ventajas de esta incipiente tecnología, se analiza la forma de implementarla en Tucumán, y es el equipo técnico del Ingenio Concepción, con los Ings. D. Vidal, J.I Lobo Viaña y J.C Cossio quienes estuvieron

más dispuestos a encarar el desarrollo comercial del cultivo de tejido para la caña de azúcar.

Como la cátedra de Caña de Azúcar de la FAZ tenía experiencia en el tema de cultivo de tejidos, con una labor de investigación de muchos años, se propuso realizar un convenio entre la Facultad de Agronomía y Zootecnia, el Ingenio Concepción y la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, para generar las vitroplantas, controlar su sanidad y adaptar su manejo en gran escala para atender los semilleros del Ingenio y sus productores cañeros.

Lamentablemente las dificultades económicas que vivía el sector en esos momentos hicieron que el proyecto no prosperara y cayera definitivamente en el año 1.998.

La idea se retomó en el año 2.000 con la conformación de un nuevo Directorio de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres que tuvo una profunda vocación por impulsar y apoyar las ideas innovadoras que abrieran nuevas perspectivas a la producción tucumana y al trabajo de esta institución en pos de afianzar los sistemas productivos vigentes y desarrollar nuevas herramientas y servicios que dieran sustento tecnológico a las alternativas productivas.

El objetivo que se planteaba en el proyecto era muy interesante, ya que además de la nueva tecnología para sanear y multiplicar rápidamente las nuevas variedades de caña de azúcar y llevarla al conjunto de productores de la provincia, se pretendía que los semilleros sirvieran como centro de difusión de todas las técnicas que fueran útiles para seguir avanzando en el proceso de mejora de la productividad en Tucumán. El proyecto comenzó a funcionar efectivamente en el año 2.001.

Desde sus inicios el proyecto tuvo una muy buena acogida en el sector, a tal punto que en la primera reunión realizada para coordinar tareas relativas al establecimiento de semilleros en la provincia asistieron importantes referentes empresariales y técnicos. La reunión se realizó en la EEAOC con la presencia del Presidente del Honorable Directorio Dr. Manuel Martínez Zuccardi, acompañado por otros miembros del Directorio, quienes, es justo decirlo, redoblaron esfuerzos para llevar adelante las acciones que demandaba la puesta en marcha del proyecto.

## **El comienzo de la producción de vitroplantas**

La primera duda surgida en la elaboración del proyecto, era si las vitroplantas se compraban a la empresa privada Biosidus, o si se las producía directamente en la EEAOC. El camino elegido fue este último, y en consecuencia comenzaron los preparativos.

El trabajo de obtención de vitroplantas se le encomendó a la Sección Fitopatología, con la Ing. C. J

Ramallo a la cabeza. En los inicios de la etapa de producción de las vitroplantas, se contó con la colaboración de una especialista de Cuba, la Dra. Odalis Nodarse, ya que ese país tenía una larga experiencia en el desarrollo y manejo de laboratorios de propagación masiva de vitroplantas o biofábricas. En el primer año, como no se contaba con las instalaciones necesarias, hubo que adaptar un laboratorio para la generación de las vitroplantas.

Para la etapa de crianza de las vitroplantas en invernáculo, se construyó uno nuevo con capacidad para 30.000 plantines, adaptado a las condiciones de seguridad sanitaria y con sistema de calefacción y riego por microaspersión automatizada. Esta etapa estuvo bajo la responsabilidad de la Ing. M.I Cuenya.


Después de la generación de las vitroplantas, se pensó en una etapa llamada de Semillero Básico, para la cual hubo que considerar el lugar adecuado. En un primer momento se pensó en realizarlo fuera de la zona cañera, pero esto traía problemas muy serios de logística para el manejo apropiado del semillero. Se buscó entonces una zona protegida de heladas, de fácil acceso, con riego y que resultara accesible para una fácil distribución de la semilla a los Semilleros Registrados que eran la etapa siguiente. El responsable de conducir el Semillero Básico fue el Ing. E. Chavanne. Los plantines saneados debían recibir un trato especial para lograr un rápido crecimiento y una alta tasa de multiplicación con material que respondiera totalmente a las características de la variedad y que además durante el período de crecimiento de los plantines conservara su sanidad, objetivo fundamental del proyecto.

El paso siguiente consistió en establecer una red provincial de Semilleros Registrados, con la doble finalidad de poner a disposición del productor cañero, material de elevada sanidad de las variedades recomendadas para su difusión en la provincia, y por otro lado, realizar un manejo del semillero que demostrara la necesidad de aplicar técnicas apropiadas de manejo a los efectos de lograr altos niveles productivos que mejoraran la rentabilidad del cañero.

De acuerdo a este propósito, era esencial aplicar toda la tecnología disponible y recomendada, para que el productor pudiera visualizar a través de visitas y días de campo, que el potencial productivo de la zona cañera de Tucumán podía crecer significativamente. Se puso mucho énfasis en este aspecto porque se consideraba que a través del Proyecto Vitroplantas se debía propiciar un crecimiento de la producción como una alternativa viable para sobrellevar un período de bajos precios en el azúcar y de amenaza permanente de importación del producto.

El salto de eficiencia se planteó como una necesidad imperiosa y para ello los Semilleros Registrados





debían de servir de nexo entre los investigadores y técnicos y los productores para una efectiva transferencia tecnológica. Esta etapa estuvo bajo la responsabilidad del Ing. Pérez Zamora.

La puesta en marcha del Proyecto Vitroplantas requirió del esfuerzo de muchos profesionales de la EEAOC, a pesar de que en este artículo solo se mencionan los principales responsables. También hay que destacar que los técnicos de la actividad privada tuvieron una participación muy activa y se mostraron siempre dispuestos a resolver los innumerables problemas que se presentaban y a tener una actitud muy positiva para sugerir aportes que permitieran llevar adelante un complejo proyecto. En realidad este caso se puede citar como un claro ejemplo de emprendimientos conjuntos entre un centro de investigación, en este caso la EEAOC y el sector productivo, en una alianza que potenció las capacidades y complementó esfuerzos para alcanzar el objetivo planteado. El éxito alcanzado con la introducción de innovaciones tecnológicas en la producción y los resultados indirectos de crecimiento de la productividad, se puede considerar que han sido producto del esfuerzo y la actitud de mejora de todo el sector de la agroindustria de la caña de azúcar.

### **El impacto del proyecto en la agroindustria**

Hoy en día es posible decir, que como consecuencia de la adopción de diversas tecnologías, la producción creció significativamente en calidad y cantidad. Tucumán pasó a producir más de 1,5 millones de toneladas de azúcar, cuando en el año 1993 produjo tan solo un poco mas de 0,5 millones de toneladas. Entre 1993 y 2008 la producción de azúcar en la provincia creció a un promedio de 6,34% lo que es una evidencia clara de

cómo impactaron el conjunto de tecnologías incorporadas al sistema productivo. Si bien el Proyecto Vitroplantas, es una de entre las varias innovaciones incorporadas por el productor cañero, hay que destacar que la forma en la que se estructuró el sistema, con participación activa de los productores, industriales y la EEAOC, resultó sumamente efectiva para facilitar la incorporación de tecnología.

La expresión máxima de éste importante salto en la productividad, se manifestó en el año 2006, zafra en la que se lograron records de rendimiento fabril final (11,27) y buenos rendimientos culturales. El resultado final, es que Tucumán alcanzó un valor promedio de entre 7.500 y 8.000 kg de azúcar producido por ha, nivel productivo que supera claramente a la media mundial, y ubica a esta zona azucarera en un muy buen nivel de competitividad.

Como consecuencia de lo señalado anteriormente, los costos de producción expresados en dólares se han reducido, lo que es muy importante para sostener el crecimiento de la producción de azúcar y además comenzar a desarrollar un mercado doméstico de alcohol combustible y a producir energía eléctrica a través de la cogeneración en los ingenios aprovechando el bagazo excedente y los restos de cosecha.

Para el futuro nos queda seguir trabajando para sacar mayor provecho del potencial que ofrece la caña de azúcar y de esa forma consolidar la rentabilidad del sector y propiciar su crecimiento, especialmente generando los nuevos productos que se suman al azúcar, y además dando pasos concretos en procura de garantizar avances en la sustentabilidad del proceso productivo.

El éxito logrado con el Proyecto Vitroplantas, es una muestra elocuente de cómo cuando se quiere, se puede.



# Producción de caña semilla de alta calidad (Proyecto Vitroplantas): logros y desafíos

Patricia A. Digonzelli, Juan Giardina, Rodrigo Ponce de León, Agustín Sánchez Ducca, Juan Fernández de Ullivarri, Jorge Scandaliaris y Eduardo Romero

## Introducción

Desde el año 2001 la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) ejecuta el proyecto Vitroplantas, destinado a producir caña semilla de alta calidad y ponerla a disposición del sector productivo azucarero. Este proyecto representa un importante compromiso de la Institución y sus técnicos para llevar adelante una innovación tecnológica de significativa trascendencia en la producción de caña de azúcar.

La forma de multiplicación agámica del cultivo de caña de azúcar (por estacas), favorece la difusión de enfermedades sistémicas que ocasionan grandes pérdidas de producción a los cañaverales comerciales cuando se emplea como semilla caña enferma. Entre estas enfermedades se destacan el mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus* y *Sorghum mosaic virus*), la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), el carbón (*Ustilago scitaminea*) y el raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) o RSD, por sus siglas en inglés (Ratoon Stunting Disease).

La caña semilla de alta calidad se caracteriza por su identidad genética (responde exactamente a las características de la variedad que se está multiplicando), su sanidad (está libre o con mínima incidencia de patógenos y plagas) y su vigor (elevada capacidad de brotación y crecimiento). Por muchos años, la poca disponibilidad de caña semilla con estas características constituyó un factor limitante de la capacidad productiva de los cañaverales tucumanos.

Las técnicas de cultivo de tejidos, tales como el cultivo de meristemas y la micropropagación, permiten obtener plantas idénticas a la madre, libres de patógenos y de gran vigor, significando una alternativa valiosa para la obtención de caña semilla de alta calidad y son empleadas en muchos países productores de caña de azúcar como: Brasil, Estados Unidos, Colombia, Cuba, Australia, entre otros (Digonzelli, P., 2006).

En el proyecto Vitroplantas de la EEAOC, la caña semilla de alta calidad se obtiene empleando el cultivo de meristemas y la micropropagación. Así, es posible obtener en poco tiempo y en un espacio redu-

cido, un gran número de plantines que cumplen con los estándares definidos para una semilla de alta calidad (identidad genética, sanidad y vigor fisiológico).

En este artículo se comentan brevemente las diferentes etapas que comprende el proyecto Vitroplantas, así como sus principales logros y desafíos.

## Etapas del proyecto Vitroplantas

La primera etapa del proyecto Vitroplantas involucra la producción de los plantines micropropagados. Ésto es responsabilidad del grupo de Biotecnología de la EEAOC, que permanentemente realiza la puesta a punto de los protocolos del cultivo de meristemas y de la micropropagación para cada una de la variedades y/o clones promisorios que se incluyen en el proyecto. Este mismo grupo de trabajo mantiene una colección de plantas madres (donantes del meristema con el que se inicia el proceso *in vitro*) de identidad y sanidad controlada. Además, han puesto a punto y estandarizado técnicas moleculares para la detección de patógenos que afectan a la caña de azúcar; estas técnicas poseen una alta sensibilidad y detectan la presencia del patógeno aunque se encuentre en concentraciones muy bajas. Así, el laboratorio de Biotecnología de la EEAOC está en condiciones de diagnosticar los agentes causales del raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), de la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y del mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus* y *Sorghum mosaic virus*).

Actualmente, tanto las plantas madres como todas las líneas de plantines (se entiende por línea a todos los plantines obtenidos a partir de un mismo meristema apical de la planta madre), que se producen en el laboratorio se diagnostican utilizando PCR, todo el material que se multiplica *in vitro* está libre de RSD, escaldadura de la hoja y mosaico de la caña de azúcar.

Para garantizar la identidad genética del material, se ha optimizado un protocolo que permite obtener los perfiles moleculares típicos de cada variedad. A cada línea proveniente de micropropagación se le realiza el perfil molecular que se compara con el típi-



co de la variedad que se está multiplicando para asegurar que el material obtenido por micropropagación es genéticamente idéntico a la variedad original (Paz *et al.*, 2008).

De esta forma se logra la mejor calidad del material vegetal para iniciar el proceso de producción de caña semilla.

Con la finalidad de permitir la trazabilidad de la producción de plantines cada línea se mantiene perfectamente identificada durante todo el proceso. En caso de que durante el proceso de laboratorio alguno de los controles, sanitarios o de identidad genética, no arroje el resultado esperado se elimina toda la línea. Este manejo permite asegurar que no se multiplique material enfermo o con variaciones genéticas.

Una vez obtenidos los plantines en laboratorio, se inicia el proceso de adaptación gradual de este material a las condiciones ambientales *ex vitro*, este proceso se denomina aclimatación. Esta es la segunda etapa en la producción de caña semilla de alta calidad dentro del Proyecto Vitroplantas y es realizada por los técnicos del subprograma de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar de la EEAOC. Esta etapa es crítica, ya que en su transcurso puede producirse la pérdida de un gran número de plantines. Para interpretar correctamente la importancia de esta etapa se debe recordar que durante el proceso *in vitro* los plantines se comportan casi como heterótrofos, presentando niveles de fotosíntesis muy bajos y obteniendo todos los nutrientes a partir de una solución acuosa (medio de cultivo) con un mínimo esfuerzo. Dentro del frasco de cultivo la atmósfera está saturada de humedad y las hojas prácticamente no han desarrollado la cutícula. El crecimiento de los plantines *in vitro* se realiza en condiciones de luz y temperatura controladas. Durante el proceso de aclimatación, este material debe superar el pasaje de un estado heterótrofo, al estado de autótrofo, desarrollar la cutícula, obtener los nutrientes a partir de un sustrato que le requiere mayor gasto energético, en resumen ser capaces de sobrevivir en condiciones ambientales nuevas. Actualmente, los protocolos para la aclimatación de las plántulas micropropagadas están bien ajustados y las pérdidas en esta etapa no superan el 10-15% (Díaz Romero y Cuenya, 2008). Durante todo el proceso de aclimatación en invernáculo se preserva la identidad de las líneas tal como fueron identificadas en el laboratorio.

En los años de funcionamiento del Proyecto Vitroplantas el grupo de Mejoramiento de la EEAOC ha logrado aclimatar en forma exitosa más de 300.000 plantines obteniendo un material vigoroso y en condiciones de soportar el trasplante al campo.

Una vez que este material está aclimatado se inician las etapas de semilleros, los cuales son lotes

destinados a la producción de caña semilla asegurando los estándares de calidad de la misma. El Proyecto Vitroplantas establece tres tipos de semilleros: Básico, Registrados y Certificados, que constituyen etapas de multiplicación en campo del material élite producido en el laboratorio y aclimatado en los invernáculos de la EEAOC (Figuras 1, 2 y 3).

El semillero Básico se implanta con los plantines provenientes de micropropagación. El mismo está ubicado en Colonia Louisiana (Dpto. Cruz Alta) y su manejo y control es realizado por técnicos de los subprogramas de Mejoramiento Genético y de Agronomía de Caña de Azúcar. El manejo de este semillero es muy cuidadoso, realizándose control de malezas mecánico y químico, aplicaciones de urea y de fertilizantes foliares, de insecticidas, fungicidas y riego. La calidad del material vegetal implantado y el manejo agronómico permiten que el promedio de producción de caña semilla en este semillero supere los 1800 kg/surco (112,5 t/ha). Las variedades comerciales producidas en el semillero Básico se han modificado con el transcurso del tiempo, respondiendo a las demandas del sector productivo. Hasta



**Figura 1. Vitroplanta de caña de azúcar producida en los laboratorios de la EEAOC.**



**Figura 2. Aclimatación de las vitroplantas en los invernáculos de la EEAOC.**



**Figura 3. a) plantines micropropagadas en el semillero Básico, b) multiplicación de caña semilla en un semillero Registrado.**

la fecha se han multiplicado las siguientes variedades: LCP 85-384; LCP 85-376; CP 65-357; TUCCP 77-42; RA 87-2; L 75-33, RA 87-3, TUC 95-37, TUC 97-8 y TUC 89-28 (Chavanne *et al.*, 2008).

El material del semillero Básico es estrictamente controlado en el aspecto sanitario. En el mes de diciembre los especialistas en Fitopatología recorren el semillero para ver sintomatología de enfermedades. En caso de detectarse cepas con síntomas de carbón o escaldadura de la hoja, éstas son eliminadas del semillero. En abril se toman muestras de tallos y se llevan al laboratorio de Fitopatología donde se determina el nivel de incidencia de RSD y de escaldadura de la hoja usando técnicas serológicas (ensayo inmunoenzimático de impresión de tejidos o TBIA, por sus siglas en inglés).

Con la caña semilla del semillero Básico se plantan los semilleros Registrados, que son la segunda etapa de multiplicación en campo dentro del esquema de semilleros del Proyecto Vitroplantas. En

esta etapa se involucra el sector productivo, ya que los semilleros Registrados se ubican en campos de ingenios, cooperativas y algunos productores. Los técnicos del subprograma Agronomía de la EEAOC asesoran el manejo agronómico de estos semilleros. Estos técnicos organizan la entrega de la caña semilla del semillero Básico, asisten a las plantaciones de los semilleros Registrados; durante el ciclo del cultivo asesoran y verifican el manejo agronómico de los mismos y previo a la cosecha, efectúan la estimación de la producción de caña semilla por variedad en cada lote semillero. El control del estado sanitario de los semilleros Registrados se realiza con el apoyo de los técnicos de la Sección Fitopatología de la EEAOC, en forma similar a lo realizado en el semillero Básico.

Los técnicos del subprograma Agronomía mantienen un contacto permanente con los semilleros, quienes son responsables de la ejecución de las labores de plantación, cultivo y cosecha de los semilleros Registrados, así como de la entrega de la caña semilla para la plantación de los semilleros Certificados (Giardina, *et al.*, 2008).

Los semilleros Certificados son la última etapa de multiplicación en campo, de la semilla de alta calidad. Con la simiente producida en estos se realizan las plantaciones y/o renovaciones comerciales. En esta etapa es donde se insertan en el sistema la mayoría de los productores, multiplicando la caña semilla de alta calidad para realizar sus propias plantaciones. Los semilleros Certificados se encuentran en campos de productores, cooperativas e ingenios, los cuales son los responsables de su manejo y control, contando con el apoyo y asesoramiento de los técnicos del subprograma Agronomía de Caña de Azúcar.


El subprograma Agronomía asume la tarea de difundir las ventajas y exigencias del uso de la caña semilla de alta calidad, para lo cual se realizan charlas, reuniones, talleres, afiches, gacetas, artículos de difusión, hojas informativas y atención personalizada a productores y semilleros.

### **Logros y desafíos del proyecto Vitroplantas**

El proyecto Vitroplantas contribuye a solucionar una problemática concreta e importante de la producción de caña de azúcar en Tucumán al poner a disposición de los productores cañeros semilla de alta calidad de los principales cultivares comerciales. Como consecuencia del empleo de este tipo de caña semilla es posible mejorar el estado sanitario de los cañaverales e incrementar su productividad.

Además, a través de este proyecto se busca difundir rápidamente las nuevas variedades de caña





de azúcar, disminuyendo significativamente la demora desde la liberación de una nueva variedad y su distribución masiva a los productores. Para alcanzar este objetivo todos los años se incluyen dentro del esquema de micropropagación y semilleros, los clones promisorios del Subprograma de Mejoramiento Genético de Caña de Azúcar de la EEAOC.

Desde su inicio, este proyecto ha ayudado a generar en los productores la conciencia respecto a la importancia de la calidad del material que se utiliza como caña semilla y de las prácticas adecuadas de manejo para lograr altas producciones. Además, la implementación de un esquema de semilleros implica una planificación de las renovaciones comerciales con uno o dos años de anticipación, lo cual ha significado un profundo cambio de mentalidad para muchos sectores de esta actividad.

Los semilleros de caña de azúcar han servido y sirven como lotes demostrativos que permiten la adopción de tecnologías que luego son aplicadas en los campos comerciales. Entre las más destacadas figuran: el empleo de las rotaciones y/o barbechos para favorecer el control de malezas, eliminar patógenos que permanecen en el suelo y/o en los restos de caña, restablecer el equilibrio en la micro y meso fauna del suelo y evitar los rebrotes de cepas viejas. Otras prácticas relevantes son: el uso de herbicidas preemergentes, generalizado en los lotes semilleros y cada vez más adoptado en los lotes comerciales; la desinfección de las herramientas y medios de carga y transporte utilizados en el manejo de la caña semilla y en las operaciones de plantación y últimamente la limpieza y desinfección de las cosechadoras. Esto último tiene como finalidad no solo evitar la reinfección de los campos con la bacteria causante del achaparramiento de la caña soca, sino también controlar la dispersión del tupulo (*Sicyos spp.*).

El proyecto Vitroplantas ha promovido el desarrollo de protocolos para el diagnóstico de enfermedades y la identificación de variedades mediante técnicas moleculares, los cuales están disponibles para ser utilizados en otras líneas de trabajo (programas de mejoramiento y producción de variedades, protocolos de cuarentena, etc.).

Dentro del marco de este proyecto se impulsa el crecimiento de un servicio de monitoreo y diagnóstico de enfermedades capaz de satisfacer eficientemente los requerimientos de la producción y simultáneamente, se intenta crear en el sector productivo la conciencia de la importancia y necesidad de moni-

torear el estado sanitario de los cañaverales en forma rutinaria y sistemática.

Para la EEAOC, el proyecto Vitroplantas significa un gran compromiso con la producción cañera e implica un trabajo permanente de mejora continua. **Los técnicos de la EEAOC asumen este compromiso y trabajan para perfeccionar todas las etapas del proyecto.** Una de sus grandes fortalezas es que permite una importante interacción entre los técnicos y el sector productivo que favorece el crecimiento tanto de la institución como de los productores.

**Un aspecto fundamental es el compromiso del sector azucarero con el éxito del proyecto. Sin la participación activa y responsable de los semilleros y productores, el proyecto Vitroplantas no podría alcanzar sus objetivos. Gracias a que el sector cañero tucumano interpreta que este proyecto les pertenece, es que el mismo ha podido y puede crecer en calidad y cantidad.**

Para la EEAOC es un proyecto transversal del que participan numerosos técnicos de diferentes secciones y/o programas. Esta alta interdisciplinariedad le confiere, desde el punto de vista institucional, un valor agregado importante ya que permite integrar el trabajo de diferentes especialistas en pos de un objetivo común. Además, reafirma la importancia y el enriquecimiento colectivo que se logra a través de la interacción entre diferentes disciplinas para el abordaje y solución de las problemáticas productivas.

Algunos de los desafíos más importantes del proyecto Vitroplantas incluyen la optimización constante de todas sus etapas para una mayor y mejor producción y manejo de la caña semilla de alta calidad, y una interacción cada vez más intensa con el sector productivo para mejorar el rendimiento y manejo de los lotes semilleros y favorecer, a partir de ellos, la aplicación de nuevas tecnologías a la producción comercial. Otros objetivos permanentes que se plantean son: incentivar el uso de caña semilla de alta calidad, lograr que cada vez más productores tengan acceso a esta simiente, alcanzar a satisfacer una demanda creciente de este tipo de semilla y conseguir que el productor cañero la considere un insumo obligatorio dentro de su esquema productivo.

**Finalmente, es fundamental involucrar cada vez más al sector productivo como los principales actores de cualquier proceso de mejora tecnológica exitoso.**

## **Bibliografía citada**

**Chavanne, E. R.; J. Giardina y A. Noguera. 2008.** Producción de caña semilla de alta calidad en el Semillero Básico de Vitroplantas durante las campañas 2001–2007. [CD ROM] Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar, 15, Tucumán, Argentina.

**Díaz Romero, C. y M. I. Cuenya, 2008.** Proyecto Vitroplantas de caña de azúcar de la EEAOC: resultados obtenidos en el área de rustificación de plantines en invernáculo entre 2001 y 2007. [CD ROM] Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar, 15, Tucumán, Argentina.

**Digonzelli, P. 2006.** Evaluación comparativa de la brotación potencial y de la dinámica de la emergencia y crecimiento inicial de caña semilla obtenida mediante las técnicas de micorpropagación

y propagación tradicional. Tesis para optar al grado de Magíster en Agronomía. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. 145 pp.

**Giardina J. A; P. Digonzelli; J. Fernández de Ullivarri; J. Scandaliaris; S. Casen y F. Leggio. 2008.** Evolución de los semilleros Registrados en la provincia de Tucumán. [CD ROM] Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar, 15, Tucumán, Argentina.

**Paz, N. del V.; M. E. Díaz; M. F. Perera; M. Sepúlveda Tusek; A. Noguera; M. P. Filippone, y A. Castagnaro. 2008.** Producción de vitroplantas de caña de azúcar en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. [CD ROM] Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar, 15, Tucumán, Argentina.





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

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

## Introducción

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

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

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

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

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

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

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

## Fases de la producción de vitroplantas

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

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

## 1- Cultivo de meristemas y micropropagación

La obtención de vitroplantas propiamente dicha consta de 5 etapas:

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

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

**1.3 Etapa 2:** Multiplicación.

**1.4 Etapa 3:** Enraizamiento.

**1.5 Etapa 4:** Aclimatación.

### 1.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal de partida

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

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



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



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

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

## 1.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo

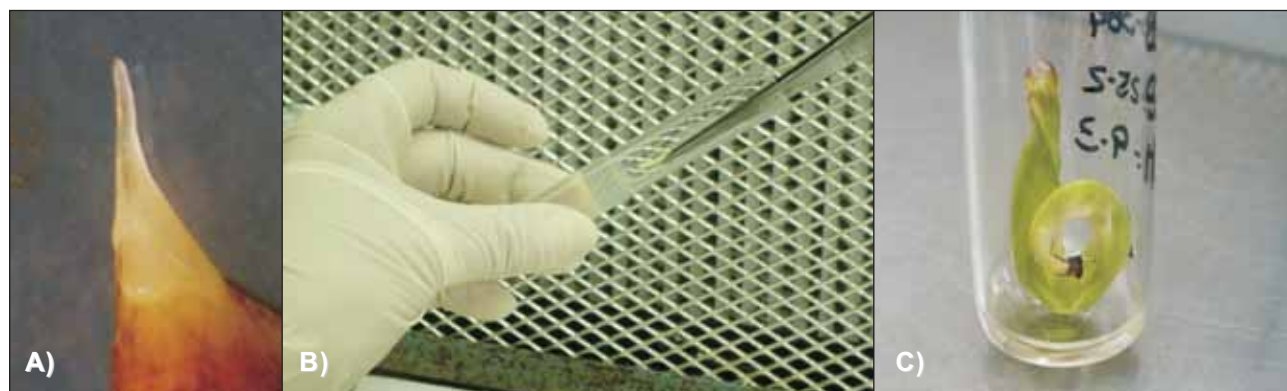
En esta etapa se establece el cultivo inicial o primario a partir del cual comienza el proceso de multiplicación. El meristema que se utiliza para iniciar la micropropagación es el apical y es obtenido de los ápices caulinares de plántulas de aproximadamente 30 días de brotación, provenientes de la plantación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

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

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



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



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



### 1.3. Etapa 2: Multiplicación

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

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

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

### 1.4. Etapa 3: Enraizamiento

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

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



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

### 1.5. Etapa 4: Aclimatación

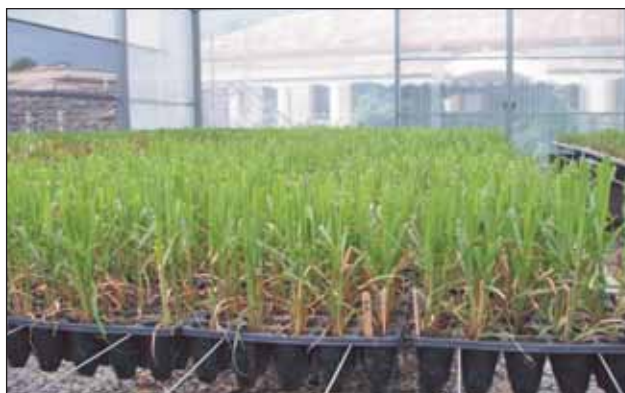
Consiste en la adaptación gradual de las pequeñas plántulas producidas *in vitro* a las condiciones ambientales de cultivo *ex vitro*: este proceso consiste en el pasaje de las mismas a un sustrato desinfectado que tiene como componentes mantillo, tierra, y un soporte inerte (perlita). Previo a la aclimatación,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



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

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

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



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

## **2. Evaluación de la pureza genética y calidad fitosanitaria**

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

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

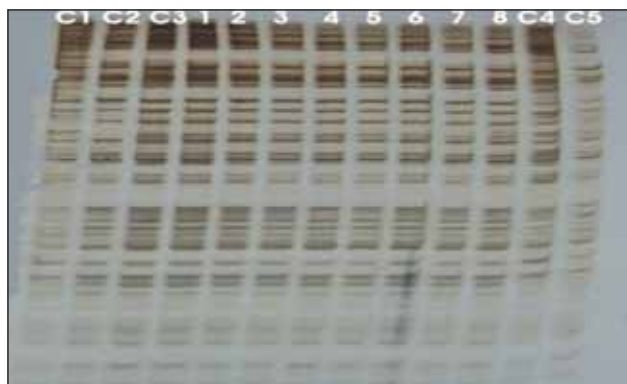
### **Evaluación de la pureza genética**

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

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

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





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

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

### Evaluación de la calidad fitosanitaria

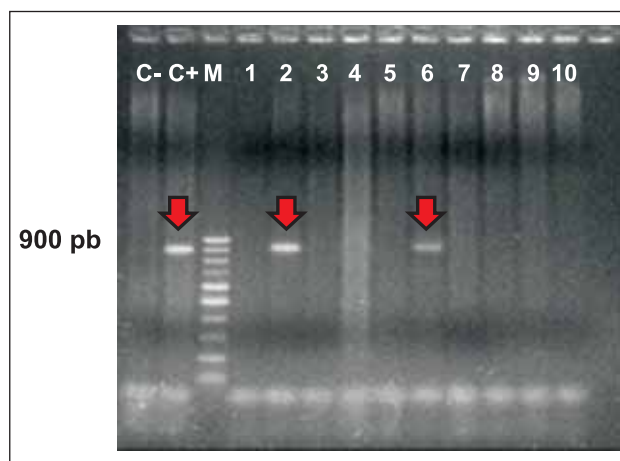
Los agentes etiológicos que se evalúan en el Proyecto Vitroplantas son los causantes de las tres enfermedades sistémicas de mayor incidencia en el cultivo: raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y mosaico de la caña de azúcar (SCMV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

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

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

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

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



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



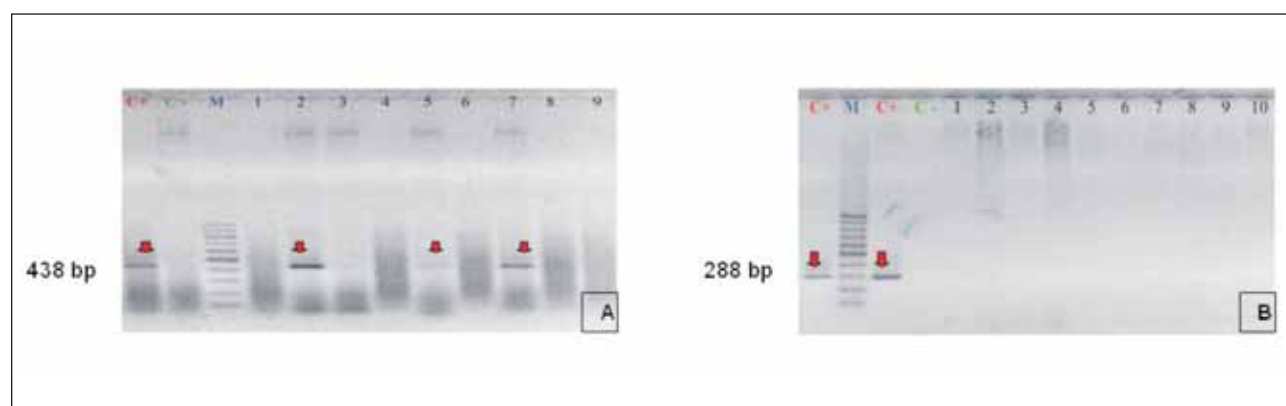
descriptos por Pan *et al.* (1998, 1999), con el cual se amplifica un segmento de ADN bacteriano de 438 pb para RSD y de 288 pb para LS, respectivamente (Fig. 9).

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

## Producción de Vitroplantas en la EEAOC

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

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



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

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

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

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

### **Bibliografía citada**

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

# Etapa de aclimatación y crianza de vitroplantas de caña de azúcar en invernáculo

Carolina Díaz Romero, María Inés Cuenya y María Beatriz García

## Introducción

El Proyecto Vitroplantas de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), concebido en el año 2000, tiene por objetivo fundamental proveer a los productores “semilla” de caña de azúcar libre de enfermedades sistémicas y con identidad genética garantizada. La utilización de este “insumo” de alta calidad, clave para incrementar la productividad de los cañaverales, no había recibido hasta entonces un tratamiento claro y sistemático dentro de la actividad cañera de Tucumán. Por lo tanto, el proyecto de la EEAOC planteó el gran desafío de realizar un sustancial cambio cultural en el medio productivo.

Dentro del ámbito técnico de la EEAOC, la generación de estos materiales de elevada calidad a gran escala, significó también el emprendimiento de un trabajo complejo e inexplorado hasta entonces. De manera que enfrentar este nuevo desafío implicó la puesta en marcha de una intensa labor de un equipo interdisciplinario, cuyos integrantes debieron aprender e implementar en un corto período de tiempo, nuevos procedimientos en cada una de las etapas del proceso. Estas etapas involucran: la obtención de plantines (vitroplantas) en laboratorio a partir de meristemas extraídos de plantas madres saneadas, la aclimatación y crianza de esos plantines en invernáculo y posteriormente, las sucesivas multiplicaciones a campo en semilleros con manejo agrónomo altamente controlado. Estas tres áreas de trabajo, claramente diferenciadas por sus propias particularidades, se encuentran estrechamente relacionadas entre sí. Justamente, el éxito del Proyecto Vitroplantas se cimentó en una efectiva interconexión dentro de este equipo interdisciplinario, que fue capaz de implementar esta novedosa tecnología y de perfeccionarla a través del tiempo, elevando los estándares de calidad en cada eslabón del proceso.

Las vitroplantas obtenidas por micropropagación son plantines de naturaleza muy frágil que deben ser transferidos desde el laboratorio (con condiciones completamente controladas) al invernáculo (con un ambiente menos controlado) para desarrollarse y lograr la supervivencia en su posterior trasplante a

campo. La etapa de aclimatación y de crianza de estos delicados plantines en invernáculo constituye, por lo tanto, una fase muy crítica ya que los mismos sufren importantes transformaciones intrínsecas, que permitirán un desarrollo autónomo y un crecimiento vigoroso. Por este motivo, dentro del invernáculo debe implementarse un conjunto de prácticas especiales de manejo para evitar pérdidas, que pueden llegar a ser elevadas, por la extremada fragilidad de los plantines originados en el laboratorio.

En los inicios del Proyecto Vitroplantas, la crianza de estos valiosos materiales en invernáculo resultó un importante desafío porque se carecía de experiencia en el manejo y de una infraestructura adecuada para lograr su producción a gran escala. En muy pocos meses se logró recopilar antecedentes, consultar a especialistas y adaptar infraestructura ya existente en la EEAOC, para llevar a cabo la crianza de una población, que en el año de lanzamiento del Proyecto (2001) alcanzó los 80.000 plantines.

En el presente trabajo se describen los procedimientos empleados en el área de aclimatación y crianza de vitroplantas dentro de invernáculo, presentándose además, los resultados obtenidos durante nueve campañas de generación de estos materiales (2001-2009) en la EEAOC.

## Manejo de vitroplantas durante las fases de aclimatación y de crianza en invernáculo

Luego del proceso de micropropagación llevado a cabo en laboratorio en condiciones controladas (Noguera *et al.*, 2000; Ramallo *et al.*, 2001), se generan plantines que poseen características morfológicas y fisiológicas propias de un estado heterótrofo: tallos delgados, bajo contenido de ceras cuticulares, alto contenido de agua en las células, estomas con baja funcionalidad y escasa capacidad fotosintética (Pérez Ponce, 1998). Estas características hacen que el trasplante en invernáculo (pasaje de *in vitro* a *in vivo*) constituya una fase muy crítica dentro de todo el proceso, siendo esperable un considerable porcentaje de pérdidas, variable de acuerdo al cultivar. Por estas razones, los plantines deben ser accli-



matados gradualmente a las condiciones naturales (menor humedad relativa, mayor intensidad de luz y medio séptico) para lograr progresivamente un crecimiento autótrofo.

### Fase de aclimatación

El proceso de aclimatación de las vitroplantas comienza en el laboratorio, donde los materiales acondicionados (separados y podados) son sumergidos en una solución con fungicida durante 24 h a temperatura ambiente y expuestos a la luz natural. Los plantines además, son clasificados por variedad y por línea (conjunto de vitroplantas que provienen de un mismo meristema). En esta instancia, el estado sanitario y la pureza genética de cada línea ya fueron evaluados, mediante técnicas moleculares, descartándose líneas enfermas o aquellas que resultan ser genéticamente diferentes de la planta madre. Por lo tanto, esta clasificación inicial permite implementar un esquema de “trazabilidad” en los materiales, efectuándose un trasplante perfectamente sectorizado e identificado (por variedad y por línea) dentro del invernáculo, ordenamiento que se mantiene hasta la primera etapa de multiplicación en campo (semillero Básico). Este sistema permite eliminar líneas enteras, si se llegan a detectar en semillero Básico, plantas enfermas o fuera de tipo. Previo al trasplante en invernáculo, los plantines se clasifican además, en grupos de diferentes tamaños: 1) mayor a 7 cm, 2) entre 7 y 5 cm, 3) entre 5 y 3 cm y 4) menor a 3 cm, incluyéndose en este último grupo a las plantas que no presentan raíz. Esta tarea es muy importante ya que se logran camadas de plantas con crecimiento homogéneo, lo cual facilita el manejo posterior dentro del invernáculo. En la Figura 1 pueden observarse vitroplantas clasificadas según los tamaños enunciados.

El trasplante se efectúa en bandejas plásticas con celdas individuales como se muestra en la Figura 2. Dichas bandejas contienen un sustrato desinfecta-

do compuesto por mantillo, tierra y perlita en proporciones 3:2:1, respectivamente.

La primera fase de aclimatación en el invernáculo consiste en trasplantar a las vitroplantas en un sector especialmente acondicionado, donde se controlan fundamentalmente la luz y la humedad relativa del ambiente. La intensidad lumínica se disminuye con coberturas de tela con un 50% de intersección de la luz, colocadas en el techo y en los laterales de los bancos de crianza (Figura 3). La humedad ambiental se mantiene entre el 80 y el 100%, utilizándose un sistema de aspersión computarizado que emite con alta frecuencia una fina neblina de agua durante períodos cortos de tiempo. La temperatura se controla sólo cuando la misma descende por debajo de 20°C.




**Figura 2: Trasplante de vitroplantas en bandejas con celdas individuales.**



**Figura 1: Grupos de vitroplantas clasificadas por tamaño antes del trasplante.**



**Figura 3: Sector con cobertura y cortinas corredizas para control de luminosidad y aspersores (en parte superior) para control de humedad relativa.**



Inmediatamente luego del trasplante, se realizan aplicaciones de fungicidas y de un complejo nitrogenado de absorción radicular a base de aminoácidos y proteínas que favorece la rápida recuperación de los plantines en esta fase crítica de gran estrés. Los materiales permanecen dentro de este ambiente especial durante las dos primeras semanas posteriores al trasplante.

En esta etapa, y a pesar de los recaudos tomados, es normal la ocurrencia de pérdidas de plantines. Se ha observado que la supervivencia depende de múltiples factores tales como: el estado general de las plantas provenientes del laboratorio, la variedad, el tamaño y el grado de desarrollo radicular de los plantines y la temperatura. Aquellas plantas que provienen del laboratorio con un aspecto general de mayor fragilidad (tallos más delgados, baja proporción de raíces, etc), presentan una mayor probabilidad de pérdidas. También, se ha observado que hay variedades que se aclimatan rápidamente, evidenciando muy bajo nivel de pérdidas. Con respecto al tamaño, aquellos plantines con tamaño inferior a 3 cm y/o sin raíz, son los más propensos a perderse, por lo cual, su trasplante se realiza en grupos de 2 a 4 vitroplantas por celda, para lograr un aprovechamiento más efectivo del espacio disponible. A veces, los plantines de gran tamaño (mayor a 7 cm) muestran un alto porcentaje de pérdidas, probablemente debido a una mayor superficie de transpiración de la planta en esta fase crítica. La ocurrencia de temperaturas muy elevadas (superiores a 38-40°C), puede provocar una mayor deshidratación y por lo tanto, mayores pérdidas. Temperaturas por debajo de 20°C, provocan también un bajo porcentaje de supervivencia, por lo que el trasplante en meses invernales debe realizarse con calefacción.

Durante las campañas 2001-2009, la época de trasplante de vitroplantas en invernáculo ocurrió en forma variable entre junio y diciembre (Díaz Romero *et al.*, 2005). Este amplio período es consecuencia, por un lado, de baja disponibilidad de mano obra en laboratorio para producir el total anual requerido (40.000 a 45.000 plantines) en un período de dos meses y por otra parte, de la limitada capacidad del sector del invernáculo disponible para la fase de aclimatación inicial. Este sector alberga camadas de alrededor de 5.000 plantines cada quince días. En la actualidad, la EEAOC está abordando la superación de esta limitación, con el objetivo de restringir el trasplante de plantines en invernáculo a los meses de junio y julio, finalizando la crianza entre septiembre y octubre. Esto permitirá una implantación temprana de las vitroplan-

tas a campo y por lo tanto, la producción de un volumen considerable de caña semilla en semillero Básico en el primer año.

### Fase de crianza

En los inicios del Proyecto Vitroplantas, el esquema de crianza comprendía una segunda fase de aclimatación, la cual se realizaba en otro sector del invernáculo en el cual, los materiales eran sometidos a un incremento progresivo de la luminosidad y a una disminución paulatina de la humedad ambiental. Este “segundo ambiente” se lograba con una cobertura con tela de “sombreo” del 35% y aplicando una menor frecuencia de riegos, que en la primera fase de aclimatación (Cuenya *et al.*, 2001). Con el transcurrir de varias campañas, se observó que esta segunda fase de aclimatación no era necesaria, obteniéndose mejores resultados cuando se pasaban los materiales desde el ambiente controlado de la primera fase de aclimatación a las condiciones naturales de luz y de humedad del invernáculo. En la actualidad, las vitroplantas, luego de los 15 primeros días de aclimatación, son transferidas a otro sector del invernáculo sin control de luz ni de humedad relativa, y sometidas a un proceso de crianza intensivo. En esta etapa se efectúan fertilizaciones semanales, aportándose N, P, K y micronutrientes para favorecer el desarrollo y el macollaje. Se controla la sanidad de los plantines con aplicaciones semanales de fungicidas y aplicaciones quincenales de insecticidas. Además, se realizan podas cada siete a diez días, desinfectándose las herramientas en soluciones de hipoclorito de sodio (20%), luego del corte. Esta última labor se ilustra en la Figura 4.

En algunas campañas, para incrementar los materiales de algunas variedades, se realizó la labor de “deshijado” o separación de los plantines a partir de macollos suficientemente desarrollados. Esta operación se efectúa entre los 20 y 30 días posteriores al trasplante con un estricto control de asepsia en la manipulación. Esta práctica resulta muy interesante en aquellas situaciones en las que, por distintas razones, se necesita incrementar en forma rápida y en etapa de invernáculo, materiales de una determinada variedad. Con este procedimiento, se lograron obtener hasta 4 o 5 individuos vigorosos y sanos por planta.

Luego de tres a cuatro meses de crianza, las vitroplantas alcanzan un desarrollo adecuado con múltiples macollos engrosados y están en condiciones de ser trasplantadas en campo. En la Figura 5 se muestran vitroplantas en condiciones óptimas para la implantación en la primera etapa de multiplicación en campo (semillero Básico).





**Figura 4: Labor de poda de vitroplantas con herramienta desinfectada.**

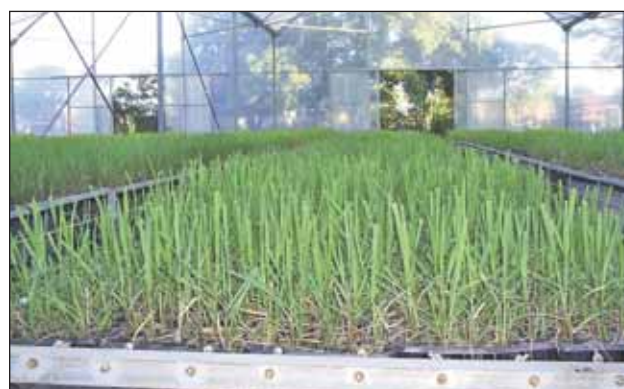
### **Evolución de la infraestructura para crianza de vitroplantas**

En los inicios del Proyecto se debió adecuar un sombráculo del Subprograma de Mejoramiento Genético de Caña de Azúcar para destinarlo a la crianza de las vitroplantas. Para un mejor control de las bajas temperaturas se realizó un cerramiento con plástico y se instaló un calefactor para mantener la temperatura en valores superiores a 20°C en la época invernal. Este invernáculo contaba con una capacidad de 25.000 plantas, lo cual resultaba insuficiente, dado que el Proyecto estableció como base inicial a partir de 2002, una población de 30.000 a 35.000 plantas efectivamente implantadas en campo (equivalentes a 3-3,5 ha). De tal manera que durante varias campañas hubo que utilizar otros espacios cedidos por el Subprograma de Mejoramiento. A pesar de las múltiples limitantes del sombráculo “reciclado” y de los otros espacios alternativos, los esmerados cuidados y las ingeniosas ideas para sortear las dificultades, contribuyeron a generar nueve camadas de vitroplantas con muy buen desarrollo.

A partir de 2008, se concretó la instalación de un moderno invernáculo que amplió la capacidad de crianza a 50.000 plantas y que además, cuenta con un sistema de ventilación automatizado. En la Figura 6 se presenta una vista del nuevo invernáculo.

### **Resultados obtenidos en la fase de crianza entre los años 2001 y 2009**

Entre 2001 y 2009, la metodología de manejo



**Figura 5: Vitroplantas con tamaño adecuado para el trasplante a campo.**

para la crianza de vitroplantas en invernáculo se fue ajustando progresivamente, llegándose a producir nueve generaciones de estos materiales saneados que lograron establecerse exitosamente en el campo. En la Tabla 1 se discriminan para cada variedad, los totales de plantines y los años en que los mismos fueron aclimatados en invernáculo.

Se observa que las variedades comerciales micropropagadas durante el período especificado fueron: LCP 85-384, RA 87-3, TUCCP 77-42, CP 65-357, LCP 85-376, RA 87-2 y L 75-33, produciéndose un volumen de plantines decreciente por cultivar en ese orden. En efecto, el Proyecto Vitroplantas puso énfasis en LCP 85-384, variedad liberada comercialmente en 1999 y de la cual se llegaron a producir 99.740 vitroplantas. Los materiales saneados de este cultivar se produjeron en gran cantidad en 2001 (casi 45.000 plantines), con el objetivo de disponer de un gran





**Figura 6: Nuevo Invernáculo para aclimatación y crianza de vitroplantas.**

74% del total, se produjeron en la primera campaña en 2001. Esta variedad, con elevada susceptibilidad a todas las enfermedades sistémicas de importancia en Tucumán, demostró un notable incremento en su productividad a partir de la implantación de semilla saneada (García *et al.*, 2005). Sin embargo, CP 65-357 fue paulatinamente reemplazada en su área de cultivo por LCP 85-384 (Cuenya *et al.* 2005, 2009), por lo cual, la demanda de semilla saneada de esta variedad disminuyó significativamente. En consonancia con esta situación, el Proyecto Vitroplantas produjo a partir de 2003, muy baja cantidad de materiales sanados de CP 65-357. Situaciones similares se produjeron con LCP 85-376 y RA 87-2, variedades liberadas en 1999, pero que no lograron imponerse en el medio productivo, por lo cual esta baja demanda se reflejó inmediatamente dentro del Proyecto, suspendiéndose su micropropagación a partir de 2004.

**Tabla 1: Total de vitroplantas aclimatadas en invernáculo y años de micropropagación discriminados según variedad.**

Variedades y Clones promisorios	Años de micropropagación	Total de vitroplantas
LCP 85-384	2001 y 2003 a 2009	99.740
RA 87-3	2001 a 2009	46.702
TUCCP 77-42	2001 a 2009	27.606
CP 65-357	2001, 2003, 2005 y 2006	21.645
LCP 85-376	2001 a 2003	8.535
RA 87-2	2001 a 2003	6.322
L 77-33	2003 a 2005	3.662
TUC 97-8	2005 a 2009	17.893
TUC 95-37	2005 a 2009	19.574
TUC 89-28	2005 a 2008	3.970
Clones promisorios	2004 a 2009	28.968
<b>Total general</b>		<b>284.617</b>

volumen de semilla saneada de esta excelente variedad, que había sido lanzada al gran cultivo de Tucumán dos años antes.

RA 87-3 fue el segundo cultivar con respecto a cantidad de vitroplantas producidas (46.702 plantines). Esta variedad, liberada comercialmente en 2003, fue ampliamente difundida a través de esta semilla de elevada calidad y logró incrementar su área de cultivo en Tucumán en casi el 7% entre las campañas 2004/05 y 2007/08 (Cuenya *et al.*, 2009).

Del cultivar TUCCP 77-42 se produjo un total de 27.606 vitroplantas, siendo la demanda de semilla saneada de esta variedad sostenida a través de estos nueve años.

De CP 65-357 se generaron 21.645 vitroplantas, de las cuales, alrededor de 16.000, es decir el

La variedad L 75-33, constituyó un caso especial, puesto que la EEAOC produjo vitroplantas de la misma a partir de solicitudes por parte del medio productivo. Esta variedad, vulgarmente conocida como "lagunera", por su buena adaptación a suelos anegadizos o con napa freática alta, tampoco tuvo una producción elevada ni sostenida en el tiempo.

La inclusión en el Proyecto Vitroplantas de clones promisorios del Subprograma de Mejoramiento Genético, con firmes perspectivas de convertirse en variedades comerciales, tuvo como objetivo disponer de semilla saneada de una nueva variedad, al poco tiempo de la liberación de la misma. Es así, que la EEAOC anunció el lanzamiento de tres nuevos cultivares (TUC 89-28, TUC 95-37 y TUC 97-8) en abril de 2009 y durante ese mismo año se logró entregar

semilla saneada de estas variedades proveniente del semillero Básico para ser implantada en la red provincial de semilleros Registrados. Esta política de inclusión anticipada, se puso en marcha a partir de 2004 y se mantiene desde entonces con aquellos clones de comportamiento destacado que pueden convertirse en el futuro en variedades comerciales. Esta estrategia planteada afianza el objetivo esencial del Proyecto Vitroplantas de difundir aceleradamente semilla de elevada calidad de variedades de nueva creación y ya difundidas.

Durante el período 2001-2009, el área de crianza de vitroplantas en invernáculo logró desarrollar 284.617 plantines, con los cuales se implantaron alrededor de 25 ha de semillero Básico. Esta superficie inicial dio origen a una red provincial de semilleros Registrados y Certificados, que manejados con alta eficiencia, se constituyeron en la fuente de semilla de elevada calidad para las nuevas plantaciones comerciales (Digonzelli *et al.*, 2005). Un relevamiento reciente estima que en la campaña 2007/08, alrededor del 48% del área cañera de Tucumán estuvo implantada con semilla proveniente del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC (Cuenya *et al.*, 2009). Esta estimación y el evidente incremento en la productividad en los cañaverales provinciales, en buena parte consecuencia de la aplicación de esta moderna tecnología, demuestran el importante impacto del Proyecto Vitroplantas en el área de cultivo con caña de azúcar de Tucumán.

### Consideraciones finales

La puesta en marcha del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC implicó la creación y estrecha articulación de un equipo de trabajo interdisciplinario, que en un corto período de tiempo, logró instrumentar exitosamente esta nueva tecnología para Tucumán.

En el área de aclimatación y crianza de vitroplantas en invernáculo, se tuvieron que aprender y aplicar rápidamente nuevos procedimientos para el manejo de estos delicados y valiosos plantines producidos en laboratorio a gran escala. En esta área además, tuvo que “reciclarse” ingeniosamente infraestructura construida para otros fines, pero que en definitiva, resultó altamente eficiente para el nuevo desafío planteado. Entre 2001 y 2009 se lograron ajustar progresivamente diversas metodologías de aclimatación y crianza de vitroplantas en invernáculo, lográndose, producir en forma continua y a gran escala, plantines vigorosos que constituyeron la fuente original de semilla de alta calidad de una red provincial de semilleros de variedades comerciales ya difundidas y últimamente, de nuevos cultivares liberados por

la EEAOC.

El importante impacto de la semilla de alta calidad en la productividad de los cañaverales tucumanos, justifica plenamente la decisión tomada por la EEAOC en el año 2000 y el significativo esfuerzo realizado desde entonces.

### Bibliografía citada

- Cuenya, M. I.; C. Díaz Romero y J. Scandaliaris. 2001.** Producción de “vitroplantas” de caña de azúcar: etapa de crianza de plantines en invernadero. Avance Agroindustrial. Avance Agroind. Vol 22 - Nº 4: 7 – 10.
- Cuenya, M. I.; E. R. Chavanne; S. Ostengo; M. A. Espinosa; M. A. Ahmed y D. D. Costilla. 2005.** Distribución de variedades comerciales de caña de azúcar en el área de cultivo de la provincia de Tucumán: campaña 2004 – 2005. EEAOC. Gacetilla Agroind. 65: 12 pp.
- Cuenya, M. I.; S. Ostengo; E. R. Chavanne; M. A. Espinosa; D. D. Costilla y M. A. Ahmed. 2009.** Relevamiento de la distribución de variedades comerciales y de la aplicación de otras tecnologías en el área de cultivo de caña de azúcar de la provincia de Tucumán: campaña 2007 – 2008. EEAOC. Gacetilla Agroind. 72: 15 pp.
- Díaz Romero, C.; E. R. Chavanne; M. I. Cuenya; A. Berardinelli y A. Noguera. 2005.** Proyecto vitroplantas de caña de azúcar: resultados obtenidos entre 2001 y 2004 en las áreas de crianza en invernáculo y de manejo de semillero Básico. Avance Agroind. 26 (4): 8 - 12.
- Digonzelli, P.; E. Brito; J. Giardina; J. Scandaliaris; F. Pérez Zamora y E. Romero. 2005.** Producción de caña semilla de alta calidad: estado actual de los semilleros registrados y certificados. Avance Agroind. 26 (1): 4-8.
- García, M. B.; M. I. Cuenya; C. Díaz Romero; S. Ostengo; D. Costilla y E. R. Romero. 2005.** Efectos de la calidad de la caña semilla en el rendimiento cultural de dos variedades de caña de azúcar a través de edades de corte. Avance Agroind. 26 (4): 18 – 21.
- Noguera, A.; N. Paz; E. Díaz y J. Ramallo. 2000.** Micropropagación de caña de azúcar: obtención de plantas madres de sanidad controlada. Avance Agroind. 21 (3): 21 – 24.
- Pérez Ponce, J. N. 1998.** Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba.
- Ramallo, J.; A. Noguera; N. Paz; E. Díaz y J. Scandaliaris. 2001.** Micropropagación masiva y acelerada de caña de azúcar: propuesta de la EEAOC. Avance Agroind. 22(2): 19 – 21.



# Manejo y producción de caña semilla de alta calidad en el semillero Básico de la EEAOC durante las campañas 2001-2009

Ernesto R. Chavanne, Juan A. Giardina, Patricia A. Digonzelli  
y Aldo Noguera

## Introducción

En el semillero Básico se lleva a cabo la primera multiplicación a campo de los plantines saneados obtenidos en laboratorio por las técnicas de cultivo de meristemas y micropropagación, y aclimatados en los invernáculos de la EEAOC (Noguera *et al.*, 2000). En esta etapa se desarrollan tareas de transplante, cuidados culturales, monitoreos fitosanitarios, control de pureza genética y tareas de cosecha, que están bajo estricto control de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) (Ahmed *et al.*, 2002; Díaz Romero *et al.*, 2005). Esta etapa del Proyecto Vitroplantas, tiene como objetivo principal, la obtención de la mayor cantidad posible de material de propagación (estacas) destinado al establecimiento de los semilleros Registrados, garantizando su pureza genética, vigor y sanidad, lo que significa que este material se encuentra libre o con mínima incidencia de enfermedades tales como el raquitismo de la caña soca o RSD (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y el mosaico de la caña de azúcar (SCMV).

Por otra parte, la EEAOC cuenta con el Subprograma de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar (PMGCA), el cual hace uso del Proyecto Vitroplantas para disponer rápidamente de caña semilla de alta calidad de los nuevos cultivares liberados comercialmente. De esta manera, se intenta acelerar la difusión de los nuevos cultivares y que la misma se realice mediante el empleo de caña semilla sana y con pureza genética garantizada.

En este artículo se describen las prácticas de manejo agronómico utilizadas en el semillero Básico de la EEAOC y se mencionan los niveles de producción de caña semilla de las distintas variedades multiplicadas durante las campañas 2002-2009.

## Ubicación del semillero Básico

El semillero Básico se encuentra ubicado en un terreno de 15 ha, perteneciente al Ingenio Concepción (CACSA), a 300 m. de la ruta provincial N° 312, en la localidad de Luisiana (Cruz Alta), provincia de Tucumán (Figura 1). Su ubicación no ha cambiado

desde el inicio del proyecto en el año 2001, rotándose los distintos lotes dentro de la misma superficie total, característica que diferencia al semillero Básico de otros semilleros dentro del proyecto.

## Tareas de transplante y manejo agronómico del semillero Básico

El semillero Básico se implanta con los plantines micropropagados producidos por la EEAOC. Para realizar la tarea de transplante a campo de los mismos, se debe partir de una muy buena preparación de terreno en lotes que han permanecido en barbecho por no menos de seis meses. Durante el período de barbecho del lote, se erradicán las cepas extrañas de cultivos anteriores de caña de azúcar, ya que éstas pueden afectar la pureza varietal y pueden constituir fuentes de inóculo de enfermedades. También se realizan aplicaciones de herbicidas con la finalidad de reducir la población de malezas perennes, tales como: pasto ruso (*Sorghum halepense*), grama bermuda (*Cynodon dactylon*) y cebollín (*Cyperus rotundus*), que son un importante problema en los cañaverales.

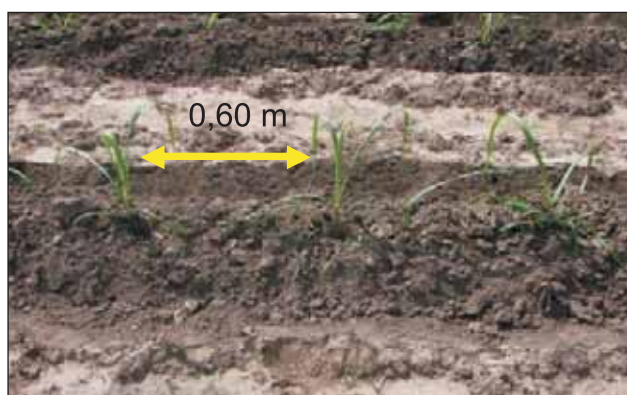
Otra alternativa muy recomendable es realizar rotaciones con algunas especies de leguminosas, tales como: caupi, dolicho, soja, etc. Es importante destacar que el semillero Básico nunca se implanta en un lote que se descepó recientemente, ya que esta medida es fundamental para garantizar la sanidad y la pureza varietal del semillero. En ocasiones, es conveniente incorporar cachaza en el lote destinado al semillero antes de la plantación, con el propósito de mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo y favorecer el crecimiento y desarrollo de los materiales en propagación.

En el semillero Básico, los plantines se transplantan mecánicamente o en forma manual, utilizando la distancia de plantación de 0,60 m entre plantas y 1,6 m entre surcos, lo cual implica el transplante de aproximadamente 10.000 plantines por hectárea (Figura 2 a y b). La duración de este semillero es de dos años, aprovechándose únicamente las producciones de caña semilla en las edades de caña planta y primera soca.

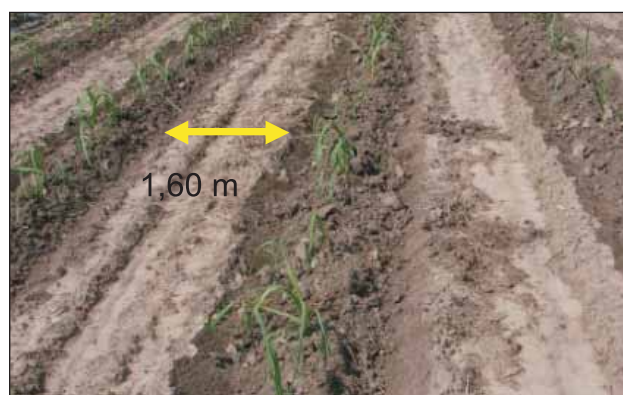




**Figura 1: Ubicación del semillero Básico en la localidad de Luisiana (Cruz Alta), Tucumán.**



**a) Distancia de 0,60 m entre plantas.**



**b) Distancia de 1,60 m entre surcos**

**Figura 2. Distancias de plantación de plantines, utilizadas corrientemente en el semillero Básico.**

El manejo agronómico del semillero Básico es cuidadosamente controlado, realizándose tareas oportunas de aporque, riego, control de malezas, fertilización y cosecha con el propósito de maximizar la cantidad de caña semilla producida por unidad de superficie, manteniendo elevado el nivel de sanidad y pureza genética de los materiales en multiplicación.

**Riego:** Para optimizar y asegurar altas producciones de caña en el semillero, se deben satisfacer las necesidades hídricas en todas las fases fenológicas del cultivo. De este modo, es de rutina aplicar un primer riego por gravedad antes de realizar el trasplante a campo de los plantines. Inmediatamente después del mismo, es necesario efectuar un segundo riego de asiento a fin de asegu-

rar el establecimiento de los plantines (Figura 3). Los excelentes resultados obtenidos en los últimos años al utilizar estas prácticas de riego en el semillero Básico, permitieron disminuir sensiblemente los porcentajes de pérdidas de plantines durante las operaciones de trasplante.

**Control de malezas:** el control de malezas es permanente y se realiza en forma manual, mecánica y química. Es muy importante que el semillero permanezca libre de la competencia de malezas desde el trasplante hasta el cierre del cañaveral, a fin de permitir un rápido establecimiento y un crecimiento vigoroso de las plantas. En el control químico de malezas se utilizan herbicidas pre- y post-emergentes de uso frecuente en el cultivo de la caña de azúcar, determi-





a) Riego inmediato posterior al transplante



b) Riego después de 30 días del transplante

**Figura 3. Riego por surco en el semillero Básico de la EEAOC.**

nando productos y dosis de aplicación de acuerdo al crecimiento del cañaveral y de las malezas.

**Aplicación de fertilizantes:** en el semillero Básico se aplican fertilizantes líquidos y sólidos, principalmente los de tipo nitrogenado, utilizando dosis divididas (2 kilogramos de urea por surco en cada aplicación), la primera en el mes de octubre y la segunda en el mes de diciembre. En caso de necesidad, se puede fertilizar con fósforo o con otro nutriente, si el tipo de suelo así lo requiere. También se puede complementar la fertilización con urea con biofertilizantes que generalmente se aplican por vía foliar.

**Pureza Genética:** el control de la pureza genética es fundamental en los semilleros, debiéndose eliminar aquellas plantas que no representen morfológicamente a la variedad original (estas plantas son denominadas “plantas fuera de tipo”). En el semillero Básico se mantienen identificadas las líneas de multiplicación en forma individual, tal como fueron obtenidas en el laboratorio de cultivo de tejidos. Esto permite evaluar fenotípicamente en el campo cada línea de multiplicación para identificar las “plantas fuera de tipo”. En caso de dudas, se toman muestras de hojas y se realizan análisis genotípicos a nivel molecular para cada línea de multiplicación. Si se detectan “plantas fuera de tipo”, en una determinada línea de multiplicación, se puede eliminar solamente esa línea y no todo el material propagado en el lote semillero.

**Control sanitario:** en el semillero Básico se realizan controles exhaustivos del estado fitosanitario de los cañaverales en proceso de multiplicación. En el mes de diciembre los especialistas recorren el semillero para detectar y erradicar las plantas enfermas con síntomas de carbón (*Ustilago scitamineae*) y escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*). Cuando la caña tiene entre 7 y 9 meses de edad (abril-mayo), se extraen muestras para determinar los niveles de incidencia de RSD (*Leifsonia xyl*

subsp. *xyl*) y de escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*). Para efectuar esto último, se toma el tercio inferior de 3 tallos por cada surco y/o línea, identificando la variedad, la edad y la línea de multiplicación correspondiente. Las muestras son remitidas al laboratorio de Fitopatología de la EEAOC para su análisis por técnicas serológicas (ensayo inmunoenzimático de impresión de tejidos o TBIA, por sus siglas en inglés). En las tareas de cosecha del semillero, se enfatiza la utilización de herramientas de corte, maquinarias y equipos de transporte cuidadosamente desinfectados con amonio cuaternario al 3 %.

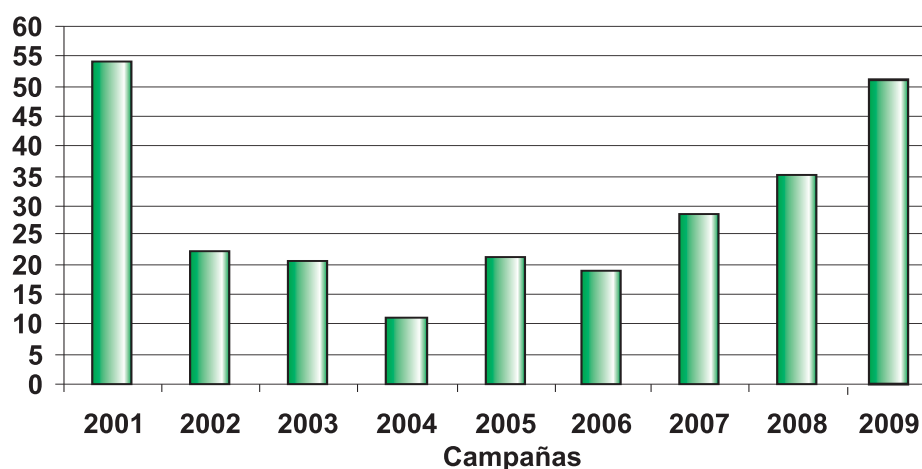
### **Cantidad de vitroplantas y producción de caña semilla de alta calidad**

Durante las campañas 2001 a 2009, se implantaron en el semillero Básico de la EEAOC un total de 263.345 vitroplantas (Figura 4), lo que equivale a la implantación anual promedio de 3 ha (alrededor de 30.000 plantines/año). En este período se multiplicó material saneado de las variedades comerciales de mayor difusión en la provincia de Tucumán, ocupando cada una distintos porcentajes de la superficie del semillero: LCP 85-384 (42%), RA 87-3 (20%), TUCCP 77-42 (11%), CP 65-357 (9%), L 75-33 (2%) y un grupo de 6 variedades promisorias, comprendiendo el 16% restante de la superficie.

Durante ocho campañas desde 2002 a 2009, se produjeron 3.687 toneladas de caña semilla, de comprobada calidad sanitaria y pureza genética, destinadas al establecimiento de la red de semilleros Registrados distribuidos estratégicamente en el área cañera de la provincia de Tucumán.

En la Tabla 1 se indica la superficie de semillero Básico, la producción total de caña semilla destinada a la implantación de los semilleros Registrados y la producción por hectárea en el período 2002 a 2009. En la campaña 2003 se produjo la mayor cantidad de caña semilla (886 t). Esta producción com-

**N° de vitroplantas  
(miles)**



**Figura 4. Cantidad de vitroplantas implantadas en el semillero básico durante las campañas 2001/2009.**

**Tabla 1. Evolución de la superficie de semillero Básico, producción de caña semilla y producción por hectárea en el período 2002-2009.**

Campaña	Superficie de semillero (ha)	Producción total de caña semilla (t)	Producción de caña semilla (t/ha)
2002	5,0	370	74,0
2003	7,2	886	123,1
2004	4,2	519	123,6
2005	2,1	289	137,6
2006	3,0	382	127,3
2007	2,7	425	157,4
2008	3,5	408	116,6
2009	3,5	409	116,8
Promedio 2002/2009	3,9	461	127,1

prendió la caña planta y la soca 1 (plantaciones realizadas en las campañas 2001 y 2002). En esa campaña, la superficie del semillero Básico fue de 7,2 ha (5 ha de semillero en edad de soca 1 y 2,2 ha de caña planta). Por el contrario, en la campaña 2005, se redujo significativamente la superficie implantada a 2,1 ha produciéndose 289 t de caña semilla y, a partir de allí, en las campañas siguientes se incrementó la cantidad de caña semilla producida hasta estabilizarse alrededor de 400 toneladas. Se observa además que la producción de caña semilla promedio anual producida por hectárea en el semillero Básico fue de 127,1 t /ha durante el período considerado.

En la Tabla 2 se detalla la cantidad de caña

semilla producida en el semillero Básico que fue utilizada en la implantación de los semilleros Registrados, discriminada por cultivares en el período 2002 a 2009. Se observa que la principal variedad multiplicada fue LCP 85-384 produciéndose 1.976 t de caña semilla, es decir el 55% de la producción total del semillero Básico. La segunda variedad fue RA 87-3 obteniéndose 694 t de caña semilla, equivalente al 19% del total producido. La tercera variedad fue CP 65-357 con 516 t de caña semilla, equivalente al 15% del total. En cuarto lugar está TUCCP 77-42 con una producción de 368 t de caña semilla (8% del total). El 2% restante del total producido, incluye a la variedad L 75-33, TUC 95-37 y TUC 97-8.



**Tabla 2. Cantidad de caña semilla expresada en toneladas producidas en el semillero Básico, discriminada por variedad durante las campañas 2002 a 2009.**

Variedad	Campaña 2002	Campaña 2003	Campaña 2004	Campaña 2005	Campaña 2006	Campaña 2007	Campaña 2008	Campaña 2009	Total
LCP 85-384	298	565	310	32	142	230	237	162	1976
CP 65-357	72	204	138		45	10	28	19	516
RA 87-3		81	14	185	134	148	65	67	694
TUCCP 77-42		36	57	49	36	37	61	92	368
L 75-33				23	25		17		65
TUC 95-37								41	41
TUC 97-8								28	28
<b>Total</b>	<b>370</b>	<b>886</b>	<b>519</b>	<b>289</b>	<b>382</b>	<b>425</b>	<b>408</b>	<b>409</b>	<b>3.688</b>

### Consideraciones finales

El proceso de producción de caña semilla de alta calidad de la EEAOC en el semillero Básico, es a la vez exigente y dinámico, ya que permanentemente se ajustan diferentes procedimientos para producir mayores volúmenes de caña semilla que satisfagan los requerimientos actuales del sector productivo cañero y que cumplan con las exigencias de elevada sanidad, pureza genética y alto vigor, aspectos que son impuestos a este tipo de material de propagación destinado al establecimiento de los semilleros Registrados.

Durante los nueve años de ejecución del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC, se lograron establecer 25 ha de semillero Básico, obteniéndose un total de 3.688 toneladas de caña semilla de alta calidad de las principales variedades de caña de azúcar, utilizadas a su vez en la formación de la red de semilleros Registrados en toda el área cañera de Tucumán.

### Bibliografía citada

- Ahmed, M. A.; E. Chavanne; A. Noguera; J. Zavaleta y J. Scandaliaris. 2002. Semillero Básico: Primera etapa de multiplicación de "vitroplantas" de caña de azúcar. Avance Agroind. 23 (2):28-30.
- Díaz Romero, C; E. R. Chavanne; M. I. Cuenya; A. Berardinelli y A. Noguera. 2005. Proyecto vitroplantas de caña de azúcar: resultados obtenidos entre 2001 y 2004 en las áreas de crianza en invernáculo y de manejo de semillero básico. Avance Agroind. 26 (4):8-12.
- Noguera, A.; N. Paz, E. Díaz y J. Ramallo. 2000. Micropropagación de caña de azúcar: obtención de plantas madres de sanidad controlada. Avance Agroind. 21 (3): 21-24.



# Evolución y situación actual de los semilleros Registrados y Certificados

Juan A. Giardina; Patricia A. Digonzelli; Agustín Sánchez Ducca;  
Rodrigo Ponce de León y Juan Fernández de Ullivarri.

## Introducción

La implantación comercial de la caña de azúcar se efectúa plantando trozos de tallos o estacas (multiplicación agámica), lo cual favorece la difusión de enfermedades sistémicas como: el mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus* y *Sorghum mosaic virus*), la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), el carbón (*Ustilago scitaminea*) y el raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyl* subsp. *xyl*) o RSD (por sus siglas en inglés). Esta última enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todas las zonas productoras de caña de azúcar del mundo y ocasiona pérdidas de producción que pueden alcanzar hasta un 50% según la susceptibilidad de las variedades, las condiciones ambientales y la presencia de otros patógenos (Victoria *et al.*, 1995; Glyn, 1997; Glyn, 2005).

En Tucumán, uno de los factores que durante años ha limitado la productividad de los cañaverales, ha sido la falta de semilleros que garanticen la disponibilidad de simiente de alta calidad, caracterizada por una elevada sanidad, pureza varietal y gran capacidad de brotación y crecimiento.

Con la finalidad de proveer de caña semilla de alta calidad a los productores cañeros de Tucumán, la EEAOC, implementó en el año 2000-2001 el Proyecto Vitroplantas. En este proyecto la caña semilla se obtiene empleando las técnicas de cultivo de meristemas y micropropagación y posteriormente este material es multiplicado en el campo en un esquema de semilleros (Digonzelli *et al.*, 2005).

En el presente artículo se comentan las características generales que deben tener los semilleros de caña de azúcar y en forma particular las etapas de semilleros Registrados y Certificados dentro del Proyecto Vitroplantas.

## Características generales de un lote semillero de caña de azúcar

Los semilleros de caña de azúcar deben ser implantados en lotes que reúnan características agronómicas óptimas para permitir que el cultivo exprese su máximo potencial productivo. Entre las

condiciones más importantes, se puede mencionar: suelos de alta fertilidad, bien drenados, con disponibilidad de riego y sistematizados, con baja infestación de malezas y en lo posible, en una zona protegida o de baja probabilidad de heladas.

Además, el semillero debe estar ubicado de manera estratégica para facilitar el aprovechamiento de la caña semilla.

Si no fuese posible cumplir con algunas de estas condiciones, deben implementarse prácticas de manejo capaces de suplir o corregir las falencias (corte temprano del semillero en zonas con riesgo de heladas, aplicación de fertilizantes, diseños especiales de plantación, tratamientos con herbicidas de preplantación, etc.) (Digonzelli *et al.*, 2009).

En todos los casos, el lote a usar para la plantación del semillero debe provenir de un barbecho de por lo menos 6 meses o de una rotación con otro cultivo (soja, caupí, etc.), para asegurar la eliminación de restos de cepas viejas que pueden afectar la pureza varietal y la sanidad del semillero, ya que son fuente de reinfección con enfermedades.

Los riesgos de reinfección de la caña semilla con patógenos causantes de enfermedades sistémicas, especialmente con el agente causal del RSD, aumentan con cada corte del semillero. A fin de asegurar niveles de sanidad adecuados, se recomienda para la producción de caña semilla, el uso de la caña planta y la soca 1 (Digonzelli *et al.*, 2004).

## Esquema de semilleros del Proyecto Vitroplantas

El esquema de semilleros que utiliza el Proyecto Vitroplantas comprende tres etapas de multiplicación en campo de los plantines micropropagados: semilleros Básico, Registrados y Certificados. El semillero Básico se implanta con los plantines micropropagados (primera etapa de multiplicación), los semilleros Registrados se plantan a partir de la caña semilla proveniente del semillero Básico y constituyen la segunda etapa en el proceso de multiplicación en campo. Con la caña semilla de estos semilleros se establecen los semilleros Certificados (tercera etapa



de multiplicación en campo), los cuales proveen la simiente para las plantaciones y/o renovaciones comerciales (Digonzelli *et al.*, 2004).

La Figura 1 muestra el esquema de semilleros utilizado en el Proyecto Vitroplantas.

Los semilleros Registrados se ubican en campos de ingenios, cooperativas y productores. Al inicio del Proyecto Vitroplantas, en el año 2002, se plantaron los primeros semilleros Registrados. En ese año fueron sólo 12 semilleros y se ubicaron al Oeste de la ruta 38 en la región del Pedemonte.

Con el avance del Proyecto Vitroplantas el número de semilleros Registrados aumentó considerablemente y en la actualidad configuran una red que se extiende por toda el área cañera. Así, en la campaña 2009-2010 se dispondrá de 50 semilleros Registrados ubicados en todas las regiones agroecológicas de la zona cañera tucumana (Figura 2 a y b).

El manejo agronómico de estos semilleros es realizado por los semilleristas bajo el asesoramiento y monitoreo permanente de los técnicos del Subprograma Agronomía de Caña de Azúcar de la EEAOC, quienes los visitan cada 20-30 días. Además, los técnicos de la EEAOC se encargan del control sanitario de los semilleros Registrados.

Los semilleros Certificados constituyen la etapa donde pueden insertarse la mayoría de los productores, multiplicando la semilla de alta calidad para sus propias plantaciones comerciales. El manejo y control de estos semilleros es responsabilidad de sus propietarios, quienes cuentan con el apoyo y asesoramiento de los técnicos del Subprograma Agronomía de Caña de Azúcar.

Cuando se va a implantar un semillero se deben tener en cuenta las necesidades para las renovaciones futuras, a fin de dimensionar adecuadamente el tamaño del semillero.

Se pueden considerar dos alternativas de implantación de lotes semilleros para los Semilleros Básico, Registrados y Certificados:

**Semilleros Temporales:** en este caso todos los años se destinan lotes diferentes para la plantación del semillero. El cambiar permanentemente la ubicación del semillero puede, en algunas situaciones, facilitar la distribución de la caña semilla, especialmente cuando los campos comerciales de caña de azúcar están dispersos en distintas zonas del área cañera.

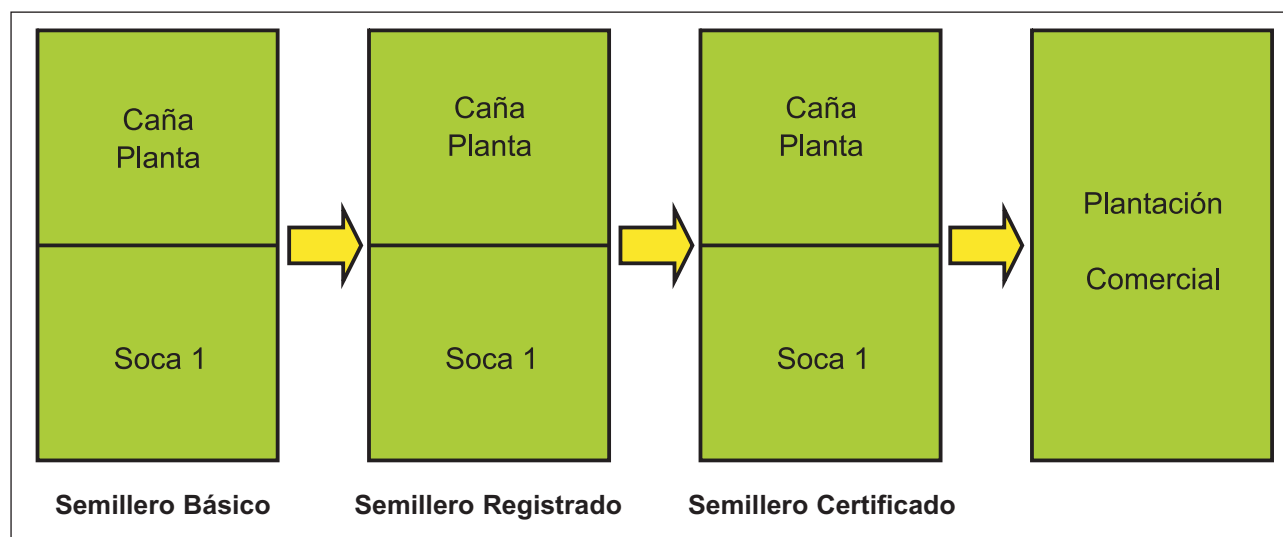
Sin embargo, no siempre se puede contar con lotes ubicados en diferentes zonas y que reúnan las condiciones óptimas para el establecimiento de un semillero.

Los semilleros temporales, luego del segundo corte de la semilla (soca 1) se transforman en lotes comerciales destinados a la producción de caña para industria (Digonzelli *et al.*, 2005).

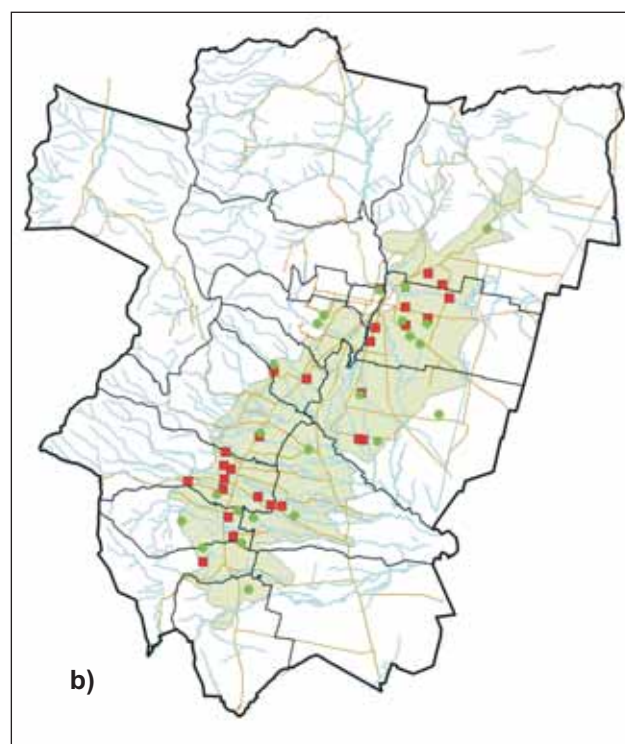
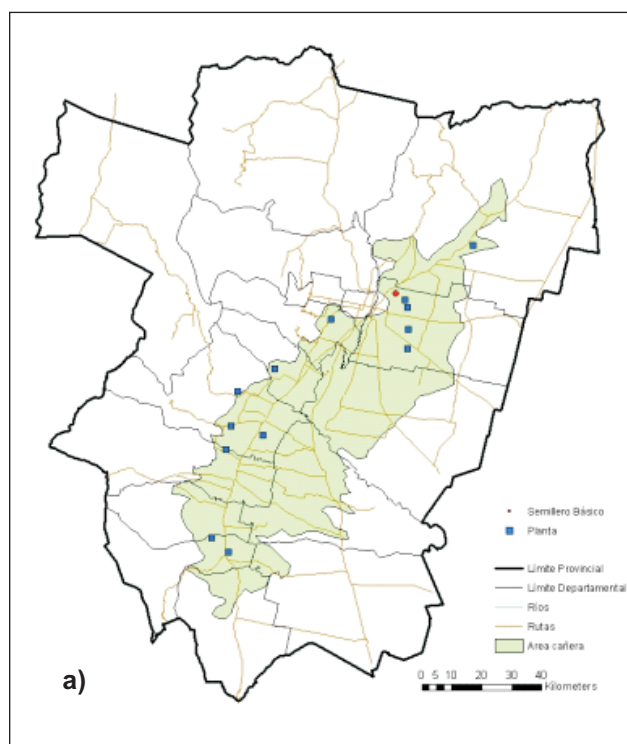
**Semilleros Fijos:** consiste en la utilización de un mismo lote, en forma permanente, para el establecimiento del semillero. Existe una serie de ventajas al disponer de un sitio fijo dedicado a la producción de caña semilla. En un esquema de semillero fijo, es más sencillo satisfacer los requisitos agronómicos que aseguran una alta producción y calidad de caña semilla, especialmente con relación al riesgo de heladas y la disponibilidad de riego, que en nuestras condiciones son fundamentales para lograr los máximos potenciales productivos.

En este tipo de semilleros, el lote se divide en tres secciones iguales y sólo un tercio del mismo se planta anualmente como semillero.

Este esquema implica la rotación dentro del lote semillero, un tercio del mismo tendrá caña planta, otro tercio soca 1 y un tercio estará en barbecho. Al año siguiente, después del corte de la semilla, el tercio con



**Figura 1. Esquema de semilleros en el Proyecto Vitroplantas en Tucumán-Argentina**



**Figura 2: Red de semilleros Registrados a) 2002 y b) 2009**

soca 1 se descepa y queda en descanso, el tercio con caña planta rebrota (soca 1) y el tercio que estaba en barbecho se planta y así sucesivamente. De esta manera, siempre se tiene un tercio del lote semillero sin caña, otro con caña planta y el tercero con caña soca 1 (Figura 3).

### Tamaño del Lote Semillero

El tamaño del lote semillero y la distribución de variedades dentro del mismo deben ser planificados en función de las necesidades de plantación y/o renovación.

No debemos olvidar que en el caso de los semilleros Registrados, éstos proveerán caña semilla para la plantación de semilleros Certificados y con la simiente de estos semilleros, se realizarán las plantaciones y/o renovaciones comerciales. Por lo tanto, este esquema implica la

planificación de las plantaciones comerciales con uno o dos años de anticipación, dependiendo de la etapa de semillero (Registrado o Certificado).

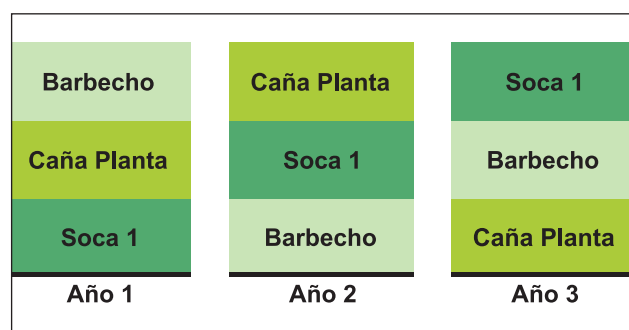
Como ejemplo, para calcular el tamaño de un lote semillero en una explotación cañera de 100 ha y con un porcentaje de renovación teórico de 20%, se deben renovar 20 ha por año.

El rendimiento promedio de caña semilla de un lote semillero con buen manejo, puede estar en alrededor de 90 t/ha. Para renovar las 20 ha, se requieren aproximadamente 240 t de caña semilla. Este volumen se puede obtener a partir de 2,7 ha de semillero Certificado. Para establecer esta superficie de semillero Certificado, se deberían disponer de 0,3 ha de Semillero Registrado (tasa de multiplicación 1: 9) (Figura 4).

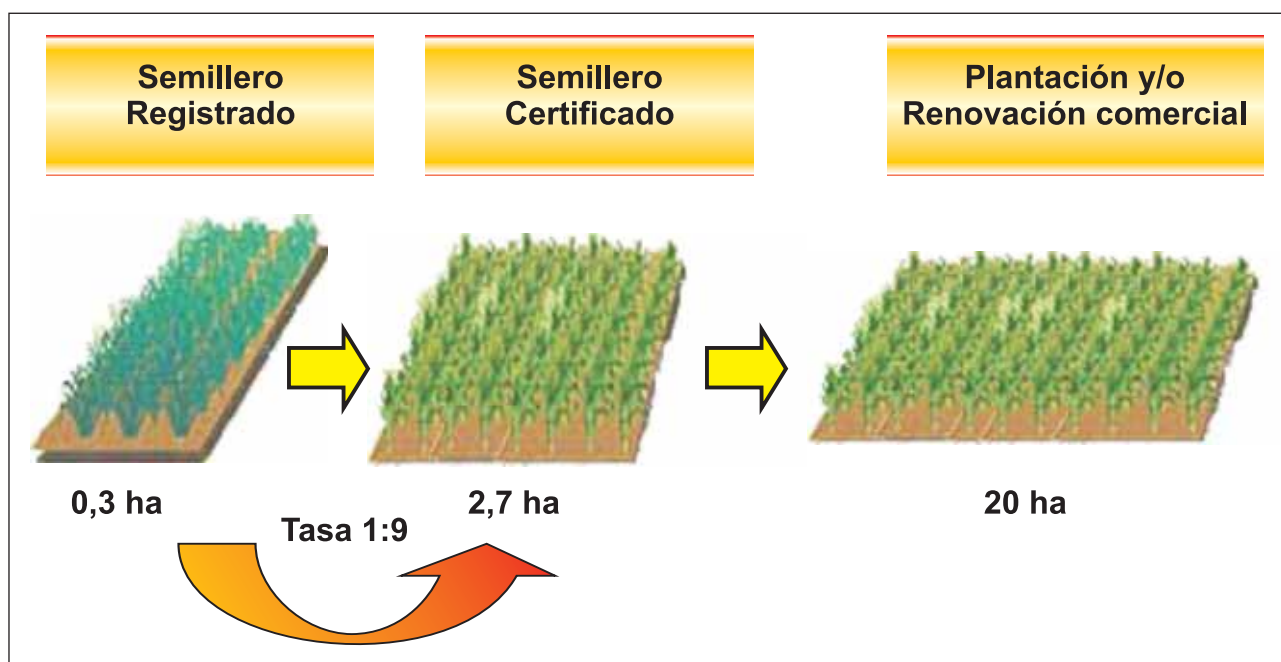
### Plantación de semilleros Registrados y Certificados

La preparación del suelo previa a la implantación de un semillero debe ser muy cuidadosa de manera de lograr una cama de siembra que favorezca la brotación de la caña semilla. El número y secuencia de labores dependerá de las características del suelo, para facilitar el íntimo contacto caña semilla-suelo, favoreciendo el crecimiento de las raíces y mejorando la infiltración del agua de lluvia o de riego y la aireación del suelo.

Una vez preparado el suelo y surcado el lote semillero, se realiza la tarea de plantación. En los



**Figura 3. Esquema de semillero Fijo.**



**Figura 4. Esquema de multiplicación de caña semilla a partir de un semillero Registrado.**

**Tabla 1. Tasas de multiplicación por variedad en la plantación de semilleros Registrados 2010.**

Variedades	Semillero Básico (Nº Surcos)	Semilleros Registrados (Nº Surcos)	Tasas de Multiplicación
LCP 85-384	98	2110	01:22
RA 87-3	34	543	01:17
TUC 77-42	46	845	01:18
CP 65-357	11	137	01:13*
TUC 95-37	24	482	01:20
TUC 97-8	15	338	01:23

\*Mayor densidad de plantación por ser caña caída y por ocurrencia de heladas.

semilleros Registrados la plantación se lleva a cabo con una densidad de nueve a diez yemas por metro (una caña con poco cruce). Esto se debe a que la caña semilla proveniente del semillero Básico es extremadamente costosa, por lo tanto se trata de alcanzar la más alta tasa de multiplicación. En los años del Proyecto Vitroplantas las tasas de multiplicación alcanzadas en las plantaciones de los semilleros Registrados han sido muy altas variando entre 1:13 a 1:24, dependiendo, fundamentalmente, de la variedad implantada (arquitectura erecta o semi-erecta) y de la ocurrencia de heladas. En caso de producirse heladas se aumenta la densidad de plantación en los semilleros para evitar fallas, esto implica la disminución de la tasa de multiplicación. En la Tabla 1 se presentan las tasas de multiplicación para cada variedad obtenidas en las plantaciones de semilleros Registrados 2010.

Por otra parte, la calidad de esta simiente per-

mite obtener porcentajes de brotación del 50 a 60% en casi todas las variedades utilizadas, lo que asegura en el lote semillero, una adecuada población final de tallos (Tabla 2).

**Tabla 2. Porcentajes de emergencia promedio para caña semilla de alta calidad en diferentes cultivares de caña de azúcar.**

Variedades	Promedio de emergencia en caña semilla de alta calidad (%)
LCP 85-384	58
RA 87-3	50
TUC 77-42	50
CP 65-357	40



Para los semilleros Certificados se recomienda una densidad de plantación de 14 a 15 yemas por metro (dos cañas cruzadas), de esta forma se obtienen tasas de multiplicación de 1:9 o 1:10 dependiendo de la variedad y desarrollo de la caña semilla utilizada. Debido a la calidad de la simiente no es necesario utilizar una mayor densidad de plantación para obtener una buena población de tallos que garantice un alto rendimiento de caña semilla en el lote semillero.

Las labores de la plantación deben realizarse en forma controlada y cuidadosa para favorecer una emergencia rápida y uniforme de tallos primarios, que constituirán la base de un cañaveral bien poblado. En los semilleros, el troceado es una práctica que debe efectuarse muy prolijamente. Se trocea en estacas de tres a cuatro yemas (largo de 50-60 cm.) para favorecer la brotación de todas las yemas disponibles, lo cual es fundamental debido a la baja densidad de plantación utilizada en estos lotes.

Todas las herramientas utilizadas en la plantación y cosecha de los semilleros, al igual que los equipos de carga y transporte de la semilla, deben estar cuidadosamente desinfectados, sumergiéndolos en una solución de Amonio Cuaternario al 3‰ o en Hipoclorito de sodio (lavandina) al 30%, durante por lo menos 5 minutos, para impedir la reinfección de la caña semilla con la bacteria causante del raquitismo de la caña soca (Figura 5).

La bacteria causante del RSD puede sobrevivir en las herramientas durante 18 días con capacidad para reinfectar, por lo cual una correcta desinfección de todos los elementos utilizados en el manejo de la caña semilla es fundamental para garantizar los estándares de sanidad exigidos a la semilla de alta calidad (Figura 6).

### Monitoreo Sanitario

El primer monitoreo sanitario de los semilleros se realiza en el mes de diciembre, para detectar por sintomatología la presencia de carbón, escaldadura de la hoja, estría roja y mosaico.



**Figura 5. Desinfección de herramientas en una plantación.**

En este monitoreo se deben marcar las plantas con síntomas de carbón y/o escaldadura de la hoja para proceder a la eliminación e incineración de esas cepas.

Durante las recorridas de los semilleros debe observarse también la presencia de plantas “fuera de tipo” las cuales deben ser eliminadas. Si el porcentaje de plantas “fuera de tipo” es alto no se recomienda usar el lote como semillero. En las experiencias de 8 años del Proyecto Vitroplantas no se observaron situaciones de este tipo.

Posteriormente, entre los meses de abril y junio, los semilleros son monitoreados para determinar el nivel de incidencia de RSD.

Para tal fin, se toman 20 tallos por cada 1 a 3 hectáreas de semillero (Registrados o Certificados, respectivamente), siempre considerando igual variedad, manejo, edad, etc.

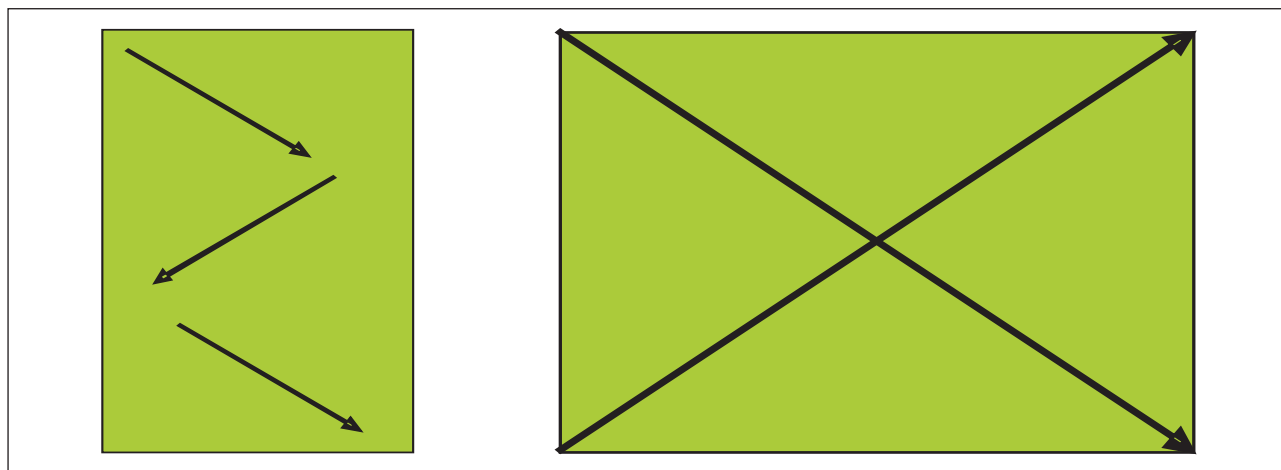
Se deben tomar las muestras en forma aleatoria para que representen el estado sanitario del lote. Para esto se cruza el lote en diagonal o en zigzag según la forma del mismo (Figura 7). Además, no debe tomarse más de un tallo por cepa y una vez cortados los 20 tallos, se separa el tercio basal de los mismos que es la porción que se lleva al laboratorio para su análisis fitopatológico. Es muy importante etiquetar e identificar correctamente las muestras para evitar errores en la interpretación de los resultados del análisis. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de etiqueta.

En el laboratorio de Fitopatología de la EEAOC, por técnicas serológicas (ensayo inmunoenzimático de



**Figura 6. Desinfección del carro plantador.**





**Figura 7. Esquema de muestreo sanitario en lotes semilleros.**

Nombre de la finca: .....
Variedad: .....
Lote: .....
Edad del Cañaveral: .....
Fecha de muestreo: .....

**Figura 8. Rótulo para las muestras que se llevan al laboratorio de Fitopatología.**

impresión de tejidos o TBIA, por sus siglas en inglés), se determinan los niveles de incidencia de RSD y/o escaldadura de la hoja.

### Consideraciones finales

El Proyecto Vitroplantas contribuye a la solución de una problemática fundamental en la producción de caña de azúcar en Tucumán, como lo es la falta de disponibilidad de caña semilla de alta calidad. Las estimaciones realizadas por la EEAOC indican que se está produciendo anualmente a través del Proyecto Vitroplantas, simiente de alta calidad para el 40-45% de las plantaciones y/o renovaciones comerciales de la provincia.

Esto significa un esfuerzo importante y coordinado realizado por la EEAOC, sus técnicos y el sector productivo, lo que se traduce en aumentos significativos de la producción de los cañaverales.


El Proyecto Vitroplantas implica, además, un cambio cultural en la producción de caña de azúcar, al exigir a través del esquema de semille-

ros una planificación anticipada de las plantaciones y/o renovaciones, tanto en lo que respecta a la superficie como a las variedades a implantar.

Por otro lado, el empleo de la caña semilla de alta calidad, permite reducir significativamente la densidad de plantación con la consiguiente reducción de los costos e incrementos de los beneficios netos, al favorecer la expresión del verdadero potencial productivo de los cultivares existentes y los recientemente liberados.

### Bibliografía citada

- Digoncelli, P., J. Giardina, E. Brito, E. R. Romero, y J. Scandaliaris. 2004.** Recomendaciones para el establecimiento y manejo de semilleros de caña de azúcar. Gacetilla Agroind. (62).
- Digoncelli, P., E. Brito, J. Giardina, J. Scandaliaris, F. Pérez Zamora y E. Romero. 2005.** Producción de caña semilla de alta calidad: estado actual de los Semilleros Registrados y Certificados. Avance Agroindustrial 26 (1):4-8.
- Digoncelli, P., E. Brito, J. Giardina, J. Scandaliaris y E. R. Romero, E. 2005.** Caña semilla de alta calidad: insumo vital para mejorar la productividad de los cañaverales tucumanos. Avance Agroind. 26 (2): 13-16.
- Digoncelli, P. A.; J.A. Giardina; J. Fernández de Ullivarri; S. D. Casen; M. J. Tonatto; M. F. Leggio Neme; E. R. Romero y L. G. P. Alonso. 2009.** Caña Semilla de Alta Calidad Obtención y Manejo. En: Romero, E. R.; P. A. Digoncelli y J. Scandaliaris, Manual del Cañero, EEAOC, Las Talitas, Tucumán,



Argentina, pp. 49-63.  
**Glyn, L. 1997.** A review of ratoon stunting disease.  
Sugarcane N° 4: 9-14.  
**Glyn, L. 2005.** Pests and diseases of sugarcane.  
Sugar Cane International. Vol. 23. N° 1: 3-14.

---

**Victoria, J.; Guzmán, M.; Angel, J. y Ochoa, O.**  
**1995.** Caña de Azúcar: El Raquitismo. Servicio  
de Información Agropecuaria del Ministerio de  
Agricultura y Ganadería del Ecuador. Proyecto  
SICA. Baco. Mundial. 3 pp.





# Enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en Tucumán

Silvina L. Giammaría, M. Belén Romero, L. Ignacio Cazón, Claudia Funes, M. Francisca Perera y Cesar R. Kairuz

## Introducción

La multiplicación comercial de la caña de azúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum* spp.) se realiza a partir de estacas o trozos de tallo de caña, comúnmente conocidos como “caña semilla”. Este tipo de propagación (agámica ó asexual) favorece la transmisión de enfermedades sistémicas y constituye el principal factor de diseminación e incremento de los valores de infección en los campos. Se denominan enfermedades sistémicas a aquellas producidas por patógenos que sobreviven sobre o dentro del tejido vegetal, invadiendo incluso las yemas, por lo cual se propagan rápidamente durante la multiplicación clonal de una variedad cuando se utiliza “caña semilla” infectada. Esto ocasiona un problema sanitario potencial, ya que la difusión de estas enfermedades sistémicas produce grandes pérdidas de rendimiento en los cañaverales comerciales (Rutherford, 2006).

Entre las principales enfermedades sistémicas de los cañaverales en el noroeste argentino se destacan el mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane Mosaic Virus*, o SCMV, y *Sorghum mosaic virus*, o SrMV), la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), el carbón (*Ustilago scitaminea*) y el raquitismo de la cañas socas (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*). A continuación, se describen los aspectos más importantes de cada una de estas patologías.

## Mosaico de la caña de azúcar

El mosaico de la caña de azúcar es la enfermedad viral más importante en los cañaverales de la provincia. En Tucumán, el mosaico es causado por dos virus: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y *Sorghum mosaic virus* (SrMV) (Perera *et al.*, 2009).

**Síntomas.** Se visualizan en las hojas y pueden variar en intensidad según la variedad, condiciones de crecimiento de la caña de azúcar y el virus involucrado. El síntoma característico, tal como lo indica el nombre de la enfermedad, consiste en un mosaico donde contrastan zonas de color verde claro o amarillentas (cloróticas) con zonas del color verde normal de la hoja. Generalmente las áreas cloróticas son difusas y más evidentes sobre la base de la hoja (Figura 1). La infec-

ción también puede observarse como manchas rojas o necróticas (Comstock y Lentini, 1991c).

**Agente causal y diagnóstico.** Los virus asociados con esta enfermedad son razas del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV, del inglés “*Sugarcane mosaic virus*”) y del virus del mosaico del sorgo (SrMV, del inglés “*Sorghum mosaic virus*”) (Yang y Mirkov, 1997; Perera *et al.*, 2009). Ambos virus forman parte del subgrupo SCMV dentro del género *Potyvirus* familia Potyviridae, y afectan además maíz y sorgo, los cuales sirven como hospedantes alternativos y fuente potencial de inóculo.

Se han identificado diferentes razas de los virus causantes del mosaico de la caña de azúcar, las cuales difieren en el rango de hospedantes, la habilidad para causar infección y la severidad del daño que producen. En todos los casos, las pérdidas



**Figura 1. Síntomas de mosaico de la caña de azúcar: decoloración de la lámina foliar con alternancia de áreas verdes y cloróticas.**



económicas dependen de la susceptibilidad del genotipo de caña de azúcar afectado, la raza del virus, la interacción con otras enfermedades, la población de vectores y las condiciones ambientales. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en todo el mundo (Koike y Gillaspie, 1989), pero en algunos países ha causado severas pérdidas económicas debido a epifitias de la enfermedad.

Hasta el momento se identificaron 44 razas, designadas de la A a la N (Grisham, 2000). En Estados Unidos, las razas más comúnmente encontradas son A, B, D y E de SCMV y H, I, y M de SrMV (Grisham y Pan, 2007).

En la Argentina son escasos los trabajos orientados al estudio de la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar y la información sobre el estado actual y local de la epidemiología es reducida. Las primeras investigaciones detectaron la presencia de la raza B del SCMV (Bennett, 1941). Ramallo (1981), determinó la presencia de las razas A y F utilizando variedades diferenciales de caña y sorgo y en 1987, determinó la presencia de la raza I del virus del mosaico del sorgo (SrMV). Entre 2004 y 2006 mediante RFLPs-RT-PCR, se detectó la presencia de las razas D y E del SCMV y otras razas no identificadas aún en la provincia de Tucumán (Fontana *et al.*, 2005). Un estudio reciente, en áreas cañeras en el Noroeste argentino, reveló que nuevos genotipos de SCMV y SrMV están asociados con los síntomas de mosaico y que su variabilidad genética sólo puede ser detectada mediante secuenciación del genoma viral. También se encontró una alta frecuencia de coinfección de ambos virus en Tucumán (Perera *et al.* 2009).

**Transmisión y control de la enfermedad.** El mosaico es una enfermedad viral que se transmite principalmente por los elementos de labranza, en especial por las herramientas de corte con las que se trocea la “caña semilla”. Cabe destacar que existe un áfido vector, *Rhopalosiphum maidis* Fitch., que disemina la enfermedad, cuyo control es ineficiente mediante insecticidas ya que el virus no se reproduce en el vector, es decir no es persistente. Hasta el momento, la única manera efectiva de controlar la enfermedad es la utilización de cultivares resistentes (Xia y col, 1999). Si bien las plantas producidas a partir de vitroplantas pueden infectarse una vez que son plantadas en el campo, es importante destacar que la “caña semilla” a utilizar no debe estar infectada con el virus con lo cual se logra mantener el cañaveral con niveles despreciables del mismo durante un lapso de tiempo considerable.

## Escaldadura de la hoja

La escaldadura de la hoja es una enfermedad bacteriana vascular que ha sido informada en los prin-

cipales países productores de caña de azúcar y que puede limitar seriamente el cultivo de variedades susceptibles (Ricaud y Ryan, 1989).

**Síntomas.** La enfermedad puede tener un período asintomático de latencia durante varios años y también puede manifestar una fase crónica o una fase aguda. Algunas plantas infectadas no tienen síntomas externos (infección latente) pero otras con síntomas pueden recuperarse y volverse asintomáticas. Esto representa un riesgo porque los síntomas pueden hacerse nuevamente visibles en las edades de soca o al replantar caña semilla infectada.

La fase crónica está caracterizada por severos síntomas externos. El síntoma típico en la hoja es una raya blanca amarillenta de 1 a 2 mm de ancho (conocido como “pencil-line”) que se extiende desde la nervadura central hasta el margen de la lámina, en dirección paralela a las nervaduras (Figura 2a), junto al síntoma de “pencil-line” puede observarse un borde amarillento difuso o áreas rojizas descoloridas a lo largo de su longitud. A medida que la enfermedad progresa, se produce necrosis desde la punta o desde el margen de la hoja.

La escaldadura puede causar clorosis parcial o total (lo cual otorga el nombre a la enfermedad) en las láminas de las hojas (Figura 2b) además de provocar menor crecimiento y marchitez en brotes. En condiciones de estrés severo esta bacteria puede causar la muerte de la cepa. Los síntomas tardíos de la enfermedad incluyen la necrosis total de la hoja y la proliferación de brotes laterales (con síntomas de escaldado y/o “pencil-line”) que se desarrollan desde la parte inferior del tallo hacia arriba, pero que mueren cuando son aún pequeños. Internamente, en los tallos afectados pueden observarse rayas rojas brillantes a oscuras causadas por la necrosis de los haces vasculares, las cuales son más notorias en los nudos y están presentes siempre cerca de la unión del brote lateral y el tallo.

La fase aguda de la enfermedad, que generalmente se presenta luego de períodos prolongados de estrés hídrico, se caracteriza por el repentino marchitamiento y muerte de tallos maduros, a menudo sin la manifestación previa de síntomas (Ricaud y Ryan, 1989).

**Agente causal y diagnóstico.** La bacteria causante de la escaldadura, *Xanthomonas albilineans*, se encuentra casi exclusivamente en los haces vasculares del xilema en la zona donde se observan las rayas blancas (“pencil-line”), pero no en los tejidos cloróticos circundantes. Esto se debe a que la clorosis característica de la enfermedad es causada por una toxina -albicidina- producida por la bacteria. La toxina puede inhibir el desarrollo de los cloroplastos y/o interrumpir el proceso normal de fotosíntesis



**Figura 2. Síntomas de escaldadura foliar. a. Síntoma “pencil line” (línea clorótica paralela a las nervaduras). b. Clorosis generalizada como resultado del efecto de la albicidina, toxina producida por *Xanthomonas albilineans*.**

(Zhang y Birch, 1994). El diagnóstico de la enfermedad se realiza a través de técnicas serológicas o moleculares (Comstock e Irey, 1992; Rott y Gabriel, 1995 y Pan *et al.*, 1997).

**Diseminación del patógeno.** La escaldadura de la hoja es una enfermedad sistémica que puede pasar inadvertida por períodos de tiempo prolongados. La “caña semilla” infectada es la principal causa de propagación del patógeno aunque las cuchillas de corte, incluidas las de las máquinas cosechadoras, constituyen también una importante fuente de infección. El patógeno puede sobrevivir en el rastrojo y en el suelo pero en este último caso por períodos de tiempo reducidos (Comstock y Lentini, 1991a). Actualmente, hay nuevas evidencias, aunque controvertidas, que sugieren la transmisión aérea del patógeno (Autrey y col, 1992).

**Prevención y control.** La severidad de los daños causados por la bacteria parece estar influenciada por las condiciones ambientales, donde períodos prolongados de estrés hídrico (déficit o exceso) y bajas temperaturas acentúan la severidad de la enfermedad. El mejor control es la prevención y la sustitución de variedades susceptibles por variedades resistentes (Ricaud y Ryan, 1989, Walker, 1987). Se recomienda plantar “caña semilla” sana (originada por micropropagación y/o tratada con termoterapia) aunque debido a la latencia de la enfermedad, los productores deben estar siempre alertas ante una posible infección, incluso en variedades resistentes. Para

prevenir la propagación mecánica del patógeno, todas las cuchillas de corte de caña, incluyendo las de las cosechadoras, deben ser desinfectadas al ingresar a un nuevo lote. La desinfección de las cuchillas puede ser realizada mediante la limpieza e inmersión de las mismas, durante varios minutos, en una solución antiséptica adecuada (hipoclorito de sodio o amonio cuaternario).

### **Raquitismo de las cañas socas**

También conocida como “achaparramiento de las socas” o más comúnmente como RSD (de sus siglas en inglés, ratoon stunting disease), es una de las enfermedades más importantes de la caña de azúcar, ya que ocasiona pérdidas de rendimiento que varían entre un 5 y 50 % (Dean y Davis, 1989; Gillaspie y Teakle, 1989). Esta enfermedad es generalmente más severa a medida que avanza la edad de la soca cuando hay condiciones de estrés hídrico y cuando se encuentran presentes otros patógenos tales como los virus causantes del mosaico de la caña de azúcar. No existe inmunidad o resistencia total a la enfermedad, pero algunas variedades evidencian niveles relativos de tolerancia a la infección (Harrison *et al.*, 1998). Por lo tanto, la alternativa más recomendable para el manejo de la enfermedad y evitar la diseminación del patógeno es la implementación de un programa de semilla saneada.

**Síntomas.** Esta enfermedad no presenta sín-



tomas visibles, por lo tanto frecuentemente pasa inadvertida. Entre las alteraciones observadas se pueden mencionar una disminución en el crecimiento de las plantas (reducción de la altura y diámetro de los tallos) y un acortamiento de los entrenudos (Figura 3b) aunque estos síntomas pueden confundirse a menudo con los ocasionados por déficit hídricos o nutricionales. En casos severos se puede afectar negativamente la brotación de la caña semilla. En algunas variedades se observa una decoloración rojiza de los haces vasculares del xilema en los entrenudos basales, al realizar un corte transversal de los tallos (Steindl, 1961).

**Agente causal y diagnóstico.** El agente causal de RSD es una bacteria aeróbica, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis *et al.*, 1984; Evtushenko *et al.*, 2000) que se aloja en los tejidos del xilema y produce el taponamiento de los haces vasculares. Esta bacteria puede ser aislada a partir de cañas enfermas pero esto resulta muy difícil porque la misma requiere de medios de cultivos sintéticos selectivos y posee un crecimiento muy lento (Davis, 1980). El diagnóstico de la enfermedad se realiza exclusivamente a través de técnicas de microscopía óptica, serológicas o moleculares que permiten detectar al agente causal de manera inequívoca (Bailey, R. A. y Fox, P. H., 1984, Davis *et al.*, 1994, Croft y col, 1994, Pan *et al.* 1998). Esto se debe a que la detección del agente causal no puede inferirse a partir síntomas externos o internos de RSD porque éstos no son uniformes en todas las variedades ni diagnósticos en sí mismos.

**Diseminación del patógeno.** La bacteria causante del RSD se aloja en los haces vasculares del tallo por lo tanto la diseminación de la enfermedad se produce principalmente por el empleo de “caña semilla” enferma. La ausencia de síntomas externos promueve el uso de esta “caña semilla” y por ende la introducción del patógeno en nuevas áreas de cultivo (Bayley y Tough, 1992). Otra forma importante de transmisión de la bacteria es a través de herramientas de corte y de las cuchillas de las cosechadoras, las cuales si no son desinfectadas correctamente propagan la enfermedad ya que pueden estar contaminadas con el jugo de plantas enfermas (Hughes and Steindl, 1955). Este hecho pone de manifiesto la importancia de realizar un diagnóstico apropiado de la caña que se destinará a futuras plantaciones, a fin de determinar tempranamente el estado sanitario de la misma.

**Prevención y control.** La bacteria causante del RSD es fácilmente transmitida en forma mecánica, por lo tanto es muy importante poner en práctica ciertas pautas de manejo que permitan mante-



**Figura 4. Muestras de tallos provenientes de semilla saneada (a) comparada con muestras de semilla inoculada con la bacteria causante del raquitiemo de la caña soca (b). (Fuente Subprograma Mejoramiento de la EEAOC).**

ner un óptimo estado sanitario de la caña que será usada como semilla. Todos los implementos utilizados para el corte de la caña deben ser desinfectados con productos químicos. Los desinfectantes que pueden usarse son principalmente solución de hipoclorito de sodio al 10% y amonio cuaternario al 3%, los cuales deben permanecer en contacto con las herramientas o cuchillas por lo menos cinco minutos. El tratamiento preventivo de la “caña semilla” mediante hidrotermoterapia (agua caliente a 50°C durante 2 a 3 horas) previo a la plantación, también es un método recomendado para eliminar la bacteria (Gillaspie y Teakle, 1989, Gillaspie y Davis, 1992).

## Carbón

El carbón de la caña de azúcar es una enfermedad de fácil diagnóstico debido a la presencia de estructuras semejantes a un “látigo” que se manifiestan en la parte terminal de los tallos afectados. Su nombre deriva de la masa negra pulverulenta de esporas, que siempre están asociadas con la enfermedad (Antoine, 1961).

El primer informe en el continente americano aparece en Argentina en 1940, desde donde se propagó a Brasil, Paraguay y Uruguay (Antoine, 1961; V. de Ramallo, 1980). Para 1943 la enfermedad se había extendido en Tucumán y, luego de la epidemia del mosaico en 1916, se la consideró como una seria amenaza para la producción de azúcar. En 1946 la crisis del carbón había cesado con la sustitución de las variedades altamente susceptibles por variedades resistentes.

**Agente causal.** Es una enfermedad fúngica causada por *Ustilago scitaminea* y afecta principalmente a los tallos de la caña. Si bien no siempre representa un problema serio, el carbón puede permanecer inadvertido por años, y recién entonces devastar grandes áreas plantadas con variedades susceptibles. Puede causar pérdidas significativas en toneladas de caña y la calidad del jugo (Victoria *et al.*, 1990). La expresión de la enfermedad es mayor en condiciones ambientales secas y calurosas (Hoy *et al.*, 1993), y depende del grado de resistencia de las variedades de caña de azúcar más difundidas (Comstock y Lentini, 1991b).

**Síntomas.** Se manifiesta con la emergencia de “látigos de carbón”, síntoma diagnóstico de la enfermedad. El látigo es un órgano cilíndrico, de longitud variable cubierto por una masa de esporas de color negro, que emerge de la parte superior de las plantas de cañas afectadas. Los látigos se originan del brote terminal o de brotes laterales en tallos infectados y están compuestos por tejido de la planta hospedante y por tejido del hongo (Ferreira y Comstock, 1989). Los látigos comienzan a emerger desde la caña infectada a los 2 a 4 meses de edad con un máximo crecimiento a los 6 a 7 meses (Comstock y Lentini, 1991b). Las cepas se van deformando, con proliferación de brotes laterales y se observa disminución del diámetro de los tallos (Ferreira y Comstock, 1989) (Figura 4).

**Diseminación del patógeno.** Las esporas de *U. scitaminea* están particularmente adaptadas a la dispersión por aire y pueden diseminarse a grandes distancias por corrientes de viento. El látigo sirve como fuente de inóculo y puede liberar hasta un billón de esporas por día. Las cañas en pie se infectan a través de las yemas, que permanecen en un estado de dormancia hasta que la caña es cortada y se usa para



**Figura 4.** Síntoma de “látigo” de carbón en el extremo terminal de la planta de caña de azúcar.

semilla. De esta manera, el uso de semilla infectada es otro importante modo de dispersión de la enfermedad (Ferreira y Comstock, 1989). Las esporas dispersas en el aire se asientan sobre el suelo cultivado o en el campo recién preparado, pero sobreviven por poco tiempo en el suelo (Comstock y Lentini, 1991b). La semilla libre de enfermedad puede infectarse si el suelo contiene esporas viables (Hoy *et al.*, 1993).

**Prevención y control.** El uso de variedades resistentes es el mejor método de control del carbón (Ferreira y Comstock, 1989). En la actualidad las variedades más difundidas en Tucumán presentan niveles aceptables de resistencia a la enfermedad. El uso de “caña semilla” saneada es también muy importante para el control de la enfermedad, ya que la infección puede ser latente y la enfermedad aparecer solo después de que la caña es plantada. En el caso de que la semilla provenga de lotes o áreas afectadas, deberían implementarse estrictas medidas cuarentenarias. La “caña semilla” puede sanearse por tratamientos de hidrotermoterapia (30 min a 50°C), aunque la eficacia de esta práctica puede variar en función de diferencias varietales (Comstock *et al.*, 1983). El marcado de cepas enfermas en el campo y su posterior eliminación (“roguing”) es otra práctica sugerida. Sin embargo, no es una práctica para epifitias severas en áreas comerciales. El “roguing” es efectivo en semilleros donde el carbón tiene una incidencia generalmente baja (Comstock *et al.*, 1983; Comstock y Lentini, 1991b). Se aconseja el uso de semilla libre de enfermedad proveniente de semilleros.

## Bibliografía citada

- Antoine, R. 1961. Smut. En: J.P. Martin *et al* (Eds.), Sugarcane diseases of the world, Elsevier Publ. Co., New York, 1:327-345.
- Autrey, L. J. C.; S. Saumtally; A. Dookun; S. Sullivan and S. Dhayan. 1995. Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas*



- albilineans*. Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol. 21: 508-526.
- Bailey R.A. and P. H. Fox. 1984.** A large-scale diagnostic service for ratoon stunting disease of sugarcane. Proc. South African Sugar Technologists' Association Annual Congress 58: 204-210.
- Bailey R. A. and S. A. Tough. 1992.** Ratoon stunting disease: survival of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, in field soil and its spread to newly planted sugarcane. Proc. South African Sugar Technologists' Association Annual Congress 66: 75-77.
- Benett, C. W. 1941.** Informe sobre experimentos con el mosaico de la caña de azúcar en Tucumán, Argentina. Rev. Ind. Agric. Tucumán 31:427-437.
- Comstock, J. C.; S. A. Ferreira and T. L. Tew. 1983.** Hawaii's approach to control of sugarcane smut. Plant Disease 67:452-457.
- Comstock, J. C. and R. S. Lentini. 1991a.** Leaf scald disease. In: Florida Sugarcane Handbook. Publication number SSAGR202. [En línea: <http://edis.ifas.ufl.edu/SC002>]. Actualizado 2005. Consultado en Septiembre de 2009.
- Comstock, J. C. and R. S. Lentini. 1991b.** Smut disease. In: Florida Sugarcane Handbook. Publication number SSAGR202. [En línea: <http://edis.ifas.ufl.edu/SC002>]. Actualizado 2005. Consultado en Septiembre de 2009.
- Comstock, J. C. and R. S. Lentini. 1991c.** Sugarcane mosaic virus. In: Florida Sugarcane Handbook. Publication number SSAGR202. [En línea: <http://edis.ifas.ufl.edu/SC002>]. Actualizado 2005. Consultado en Septiembre de 2009.
- Comstock, J. C. 1992.** Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, using tissue blot immunoassay, elisa, and isolation Techniques. Plant Disease 76:1033-1035.
- Croft, B. J.; A. D. Grte; T. M. Leaman and D. S. Teakle. 1994.** RSD diagnosis and varietal resistance screening in sugarcane using the EB-EIA technique. Proc. of the Australian Society of Sugar Cane Technology 14:143-151.
- Davis, M. J.; A. G. Gillaspie Jr.; R. W. Harris and R. H. Lawson. 1980.** Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. Science 210: 1365-1367.
- Davis, M. J.; A. G. Gillaspie, Jr.; A. K. Vidaver and W. H. Russell. 1984.** *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 107-117.
- Davis, M. J.; J. L. Dean; J. D. Miller and J. M. Shine Jr. 1994.** A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. Sugarcane 64(6): 9-16.
- Davis, M. J.; P. Rott and D. W. Gabriel. 1995.** Development of a PCR assay for diagnosis of leaf scald disease of sugarcane. J. Am. Soc. Sugarcane Technol. 16:129.
- Dean J. L. and M. J. Davis. 1990.** Losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. Journal of the American Society of Sugarcane Technologists 10: 66-72.
- Evtushenko, L. I.; L. V. Dorofeeva; S. A. Subbotin; J. R. Cole and J. M. Tiedje. 2000.** *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* (Davis *et al.* 1984) with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 371-380.
- Ferreira, S. A. and J. C. Comstock. 1989.** Smut. En: C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie Jr. and C. G. Hughes (Eds.), Disease of sugarcane. Major Diseases, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publishers B.V., p. 211 – 229.
- Fontana, P. D.; J. C. Ramallo; G. R. Vellicce; M. Ontivero; D. Ploper; J. C. Díaz Ricci and A. P. Castagnaro. 2005.** Caracterización molecular de razas del virus del mosaico de la caña de azúcar en Tucumán, Argentina. En: XIII Congr. Latinoamericano Fitopatol. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- Gillaspie, A. G. Jr. and D. S. Teakle. 1989.** Ratoon stunting disease. En: C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillaspie Jr. y C. G. Hughes (eds.), Diseases of sugarcane, major diseases, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publishers B. V., p. 59-80.
- Gillaspie, A. G. Jr. and M. J. Davis. 1992.** Ratoon stunting of sugarcane. En: Mukhopadhyay, A. N.; J. Kamar; H.S. Chaube y U. S. Singh (eds.), Plant diseases of international importance. Diseases of sugar, forest, and plantation crops, New Jersey, USA, Prentice may, Vol. 4, p. 41-46.
- Grisham, M.P. 2000.** Mosaic. En: A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J.C. Comstock, B. J. Croft, and A. S. Saumtally, eds. CIRAD/ISSCT, Montpellier, Francia, páginas 249-254
- Grisham, M.P. and Pan, Y.B. 2007.** A genetic shift in the virus strains that cause mosaic in Louisiana



- sugarcane. Plant Dis. 91: 453-458.
- Hoy, J. W.; J. Zheng; L. B. Grelen and J. P. Geaghan. 1993.** Longevity of teliospores of *Ustilago scitaminea* in soil. Plant. Dis. 77:393-397.
- Hughes, C. G. and D. R. L. Steindl. 1955.** Ratoon stunting disease of sugarcane. Queens Bur. Sug. Exp. Stn. Tech. Comm. 2: 54.
- Koike, H. and A. G. Gillaspie, Jr. 1989.** Mosaic. En: Ricaud C.; B. T. Egan; A. G. Gillaspie, Jr. and C. G. Hughes (eds.), Diseases of sugarcane: Major diseases, Science publishers, Amsterdam, p. 301-322.
- Pan, Y.; M. Grisham y D. Burner. 1997.** A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. Plant Disease 81:189-194.
- Pan, Y. B.; M. P. Grisham; D. M. Burner; K. E. Damann, Jr. and Q. Wei. 1998.** A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. Plant Disease 82:285-290.
- Perera, M. F.; M. P. Fillipone; C. J. Ramallo; M. I. Cuenya; M. L. García; L. D. Ploper and A. P. Castagnaro. 2009.** Genetic diversity among viruses associated with sugarcane mosaic disease in Tucumán, Argentina. Phytopathology 99:38-49.
- Ramallo, N. E. V. 1981.** Razas de mosaico de la caña de azúcar. Rev. Ind. Agric. Tucumán 58:57-68.
- Ricaud, C. y C. C. Ryan. 1989.** Leaf Scald. En: Ricaud, C.; B. T. Egan; A. G. Gillaspie Jr. y C.G. Hughes (eds.), Diseases of sugarcane. Major Diseases, Elsevier, Amsterdam, p. 39-58.
- Steindl, D. R. L. 1961.** Ratoon stunting disease. En: Martin, J. P.; E. V. Abbott y C. G. Hughes (eds), Sugarcane diseases of the world, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publishers B. V. Vol 1, p. 433-459.
- Vásquez de Ramallo, N. 1980.** Sugarcane smut in Argentina. First Inter-American Sugarcane Seminar (Cane diseases) Miami, Florida, U.S.A. p. 20-23.
- Victoria, J. I.; A. Amaya y C. Cassalett. 1990.** Importancia del carbón de la caña de azúcar y su estrategia de control en Colombia. Sugarcane 5:17-22.
- Walker, D. I. T. 1987.** Breeding for resistance. En: Heinz, D. J. ed., Sugarcane improvement through breeding, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 455-502.
- Xia, X.; A. E. Melchinger; L. Kuntze and T. Lübberstedt. 1999.** Quatitative trait loci mapping of resistance to sugarcane mosaic virus in maize. Phytopathology 89:660-666.
- Yang, Z. N. and T. E. Mirkov. 1997.** Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. Phytopathology 87:932-939.
- Zhang, L. and R. G. Birch. 1997.** The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:9984-9989.
-



# Diagnóstico de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en el Laboratorio de la Sección Fitopatología de la EEAOC

Silvina L. Giammaría, L. Ignacio Cazón, M. Belén Romero, Claudia Funes,  
y Cesar R. Kairuz

## Introducción

El diagnóstico es el procedimiento por el cual se identifica el agente causal de una enfermedad y consiste en una serie de pasos o etapas que permiten constatar la presencia o ausencia del mismo en una muestra determinada.

Existen varios métodos de diagnóstico que se emplean en la detección de patógenos sistémicos en caña de azúcar. Inicialmente, la observación directa de estructuras en el microscopio óptico de contraste de fases fue utilizada para el diagnóstico de agentes fitopatógenos. Actualmente los métodos de serología y de análisis molecular son los más usados porque proveen mayor precisión y rapidez en los resultados.

La Sección Fitopatología de la EEAOC cuenta con los recursos y la capacidad técnica y operativa para realizar la detección de patógenos sistémicos de la caña de azúcar utilizando ambas metodologías. La elección del método depende, principalmente, de la infraestructura del laboratorio y del nivel crítico de decisión necesario en los resultados de una muestra.

Los análisis más sensibles son aquellos que utilizan técnicas moleculares derivadas de la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (por sus siglas en inglés, polymerase chain reaction). Esta es una técnica molecular con la cual se puede obtener un gran número de copias de un fragmento específico de ADN, aún a partir de una cantidad mínima del fragmento original. Esta metodología posee una elevada sensibilidad aunque la carga patogénica sea baja, siendo factible detectar con certeza el agente causal de una enfermedad. La PCR es una técnica común e indispensable en laboratorios de investigación agrobiotecnológica. Sin embargo este método, tanto en su variante convencional como en tiempo real, es generalmente más costoso, requiere insumos especiales, equipamiento más sofisticado y una capacitación adecuada del personal técnico, en comparación con el método serológico.

Las técnicas de diagnóstico serológico y molecular difieren entre sí en la sensibilidad de la carga

patogénica, es decir, la cantidad de estructuras de un determinado patógeno que pueden detectar. En términos generales, para las enfermedades sistémicas más comunes de la caña de azúcar, las técnicas serológicas detectan entre  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  células del patógeno por ml de extracto de savia (Guzmán y Victoria, 2001), mientras que las técnicas de diagnóstico molecular por PCR pueden detectar concentraciones patogénicas de hasta 3 pg de ADN por  $\mu$ l de muestra (Viruel, 2006).

En el caso del Proyecto Vitroplantas, las evaluaciones fitosanitarias de las Plantas Madres donantes de meristemas y las líneas establecidas *in vitro* derivadas de éstas (ver capítulo "Producción de Vitroplantas en el laboratorio") se realizan mediante técnicas moleculares, debido a que asegurar la sanidad absoluta de este material es un aspecto crítico en el proceso de producción. Los protocolos de detección molecular han sido optimizados por técnicos de la Sección Biotecnología y las evaluaciones fitosanitarias son llevadas a cabo desde el 2009 en forma conjunta por técnicos de las Secciones Biotecnología y Fitopatología.

Las muestras provenientes del semillero Básico y de la red de semilleros Registrados (análisis de detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* y *Xanthomonas albilineans*) y Certificados (solamente análisis de detección de *L. xyli* subsp. *xyli*) se procesan siguiendo protocolos basados en métodos serológicos. Si bien la sensibilidad de las técnicas moleculares es mayor, tal como fuera mencionado anteriormente, el volumen de muestras y el costo asociado al procesamiento de las mismas no justifica, por el momento, su empleo en esta etapa de evaluación. Cabe destacar que la evaluación de las muestras por este método se realiza cuando la planta tiene al menos siete meses de edad, asegurando así la suficiente concentración patogénica en los tejidos vegetales (Guzmán y Victoria, 2001) que conlleve a un resultado confiable y eficiente.



La Sección Fitopatología de la EEAOC realiza la detección de las bacterias causantes del raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) y de la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) en muestras de tallos provenientes de los semilleros en el marco del Proyecto Vitroplantas. Estos análisis se realizan mediante técnicas de diagnóstico serológico y constituyen un servicio que brinda la EEAOC a los productores cañeros de la región.

## Fundamentos de las técnicas de diagnóstico serológico

La serología estudia la interacción entre anticuerpos y antígenos con el fin de identificar, caracterizar y cuantificar la reacción entre ellos. Una de las técnicas más ampliamente difundida es la inmunoenzimática de impresión de tejidos (TBIA, del inglés, tissue blot immunoassay), la cual se utiliza actualmente en la Sección Fitopatología de la EEAOC para la detección de patógenos sistémicos de caña de azúcar.

Los antígenos (y determinantes antigénicos) son proteínas o polisacáridos bacterianos, virales o de otros microorganismos que cuando son inyectados en un mamífero (principalmente conejo o ratón) originan una respuesta inmune que desencadena la producción de nuevas proteínas llamadas anticuerpos. Estos reconocen y reaccionan específicamente con el antígeno y están contenidos en el suero.

En patología vegetal, la técnica de TBIA ofrece considerables ventajas entre las que se destacan la simplicidad, alta sensibilidad, rapidez, análisis simultáneo de varias muestras, escasa influencia de la morfología del patógeno, mínimo equipamiento y entrenamiento del operario, facilidad en la interpretación de los resultados y estabilidad de los reactivos y membranas impresas por largos períodos de tiempo. Sin embargo, como desventajas se pueden mencionar el riesgo de reacciones cruzadas y la imposibili-

dad de cuantificar con exactitud la carga patológica de la muestra (Conci *et al.*, 2008).

En el TBIA el antígeno (patógeno o sus estructuras derivadas presentes en una muestra enferma) se adsorbe directamente sobre un soporte inerte (membrana de nitrocelulosa) (Fig. 1a), al cual se le agrega un agente bloqueante para evitar reacciones inespecíficas (Fig. 1b). Luego, se incuba con el anticuerpo específico del antígeno (Fig. 1c) y se aplica un segundo anticuerpo conjugado con una enzima (fosfatasa alcalina) (Fig. 1d) que reaccionará con el sustrato revelador y permitirá visualizar la reacción mediante la obtención de un producto coloreado (Fig. 1e).

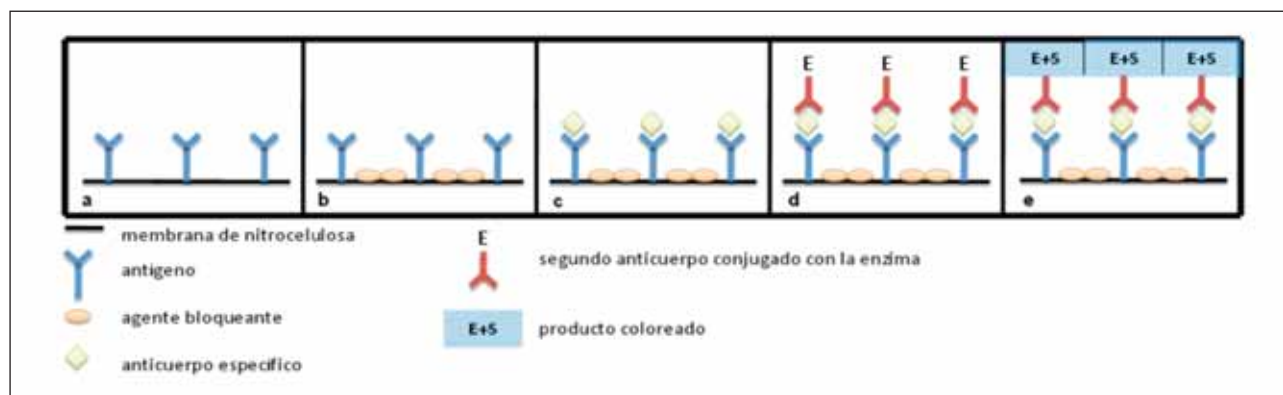
Los antisueros para los patógenos más comunes de la caña de azúcar, se obtienen, actualmente, a través de pedidos especiales en centros internacionales de investigación o empresas que comercializan los mismos. Sin embargo, la Sección Fitopatología prevé autoabastecerse, en el mediano plazo, mediante la producción de antisueros propios y así dar respuesta ilimitada a las necesidades de diagnóstico del sector productivo cañero de la provincia de Tucumán y de la región.

## Breve descripción del proceso de detección serológica

Para que el proceso de diagnóstico sea exitoso deben cumplirse ciertos pasos que comienzan mucho antes de que las muestras ingresen al laboratorio. A continuación se describen las etapas necesarias para que este servicio pueda cumplirse en tiempo y forma.

### 1. Planificación del diagnóstico

La edad óptima del cultivo para detectar la carga patológica de las bacterias causantes del raquitismo de la caña soca y de la escaldadura de la hoja, por medio de técnicas serológicas, es entre



**Figura 1. Etapas de la técnica serológica inmunoenzimática de impresión de tejidos (Tissue Blot Immunoassay).** a. Adsorción del antígeno al soporte inerte. b. Agregado del agente bloqueante. c. Interacción del antígeno con el anticuerpo específico. d. Interacción del anticuerpo específico con el anticuerpo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. e. Reacción de la enzima con el sustrato y formación del producto coloreado.

siete y nueve meses desde la brotación, coincidiendo este momento, bajo las condiciones de Tucumán, con el mes de abril. A partir de este momento el Laboratorio de la Sección Fitopatología comienza a recibir las muestras para los análisis de detección. Para esto, es fundamental planificar con anticipación las necesidades futuras de plantación.

Debido al marcado efecto detrimental sobre el rendimiento que tiene el raquitismo de la caña soca (Grisham, 1991, Rago *et al.*, 2004), es sumamente importante conocer cuál es el estado sanitario de los lotes que se destinarán a semilleros lo cual, además de asegurar la calidad del nuevo cañaveral, ayudará a disminuir paulatinamente los valores de incidencia de la enfermedad (Cuenya y col, 2007).

El orden de prioridad adoptado por el subprograma Agronomía y la Sección Fitopatología establece que en primer lugar se reciben y procesan todas las muestras provenientes del semillero Básico y posteriormente aquellas de la red de semilleros Registrados. En función de la capacidad de muestreo de campo del subprograma Agronomía, también se van asignando turnos tempranos para el procesamiento de muestras de semilleros Certificados. Luego, simultáneamente con el procesamiento de semilleros Certificados se reciben y procesan muestras provenientes de lotes comerciales.

## **2. Toma de muestras**

Para poder llevar a cabo el diagnóstico serológico, en primer lugar, deben acondicionarse las muestras en el campo. Los tallos de las muestras deben cortarse de diferentes cepas y al azar. El corte debe realizarse con machetes desinfectados con una solución de lavandina al 30% luego de cada corte, tratando de que la muestra sea representativa del lote (Fig. 2). Las muestras provenientes del semillero Básico están compuestas por tres tallos por cada surco y/o línea multiplicada. Las muestras de los semilleros Registrados están constituidas por 20 tallos por hectárea y en el caso de los semilleros Certificados y lotes comerciales la muestra está formada por 20 tallos por cada tres y cinco hectáreas, respectivamente. De cada tallo se toma la porción basal (tres a cuatro entrenudos), y se agrupan, atan y rotulan, incluyendo todos los datos del lote (fecha de muestreo, edad, variedad, número de lote, sección y origen). Posteriormente, y en forma inmediata, las muestras se remiten al laboratorio de la Sección Fitopatología para su procesamiento.

## **3. Recepción y preparación de las muestras**

Las muestras se reciben en el invernáculo de la Sección Fitopatología, donde son codificadas para resguardar su identidad. (Fig. 3a). Luego, se corta el

entrenudo basal de cada tallo con machete desinfectado y se extrae el cilindro central con un sacabocado metálico (Fig. 3b), desinfectando todas las herramientas luego de cada corte. Posteriormente los cilindros que pertenecen a una misma muestra son colocados en una bolsa de plástico con su respectivo código y transportados al laboratorio de Serología para su procesamiento (Fig. 3c). El registro de todo el proceso se lleva a cabo en un libro foliado.

## **4. Procesamiento de muestras en el Laboratorio de Serología**

Las bases de los cilindros centrales que componen la muestra se imprimen en las membranas de nitrocelulosa (Fig. 3d). Éstas se colocan en una bandeja y se dejan secar durante 10 horas en estufa a 28°C para fijar el microorganismo (“antígeno”) a la membrana. Luego, con un agente bloqueante se cubren los sitios de unión no saturados por el microorganismo para evitar reacciones inespecíficas. Posteriormente las membranas son incubadas con una solución del antisuero específico contra el antígeno en cuestión y luego se agrega una solución de un segundo antisuero el cual reconoce al primer antisuero y se une a él. El segundo antisuero tiene la particularidad de poseer una enzima conjugada en su estructura, la cual permite visualizar la presencia del antígeno mediante una reacción de color al reaccionar con su sustrato (Fig. 3e).

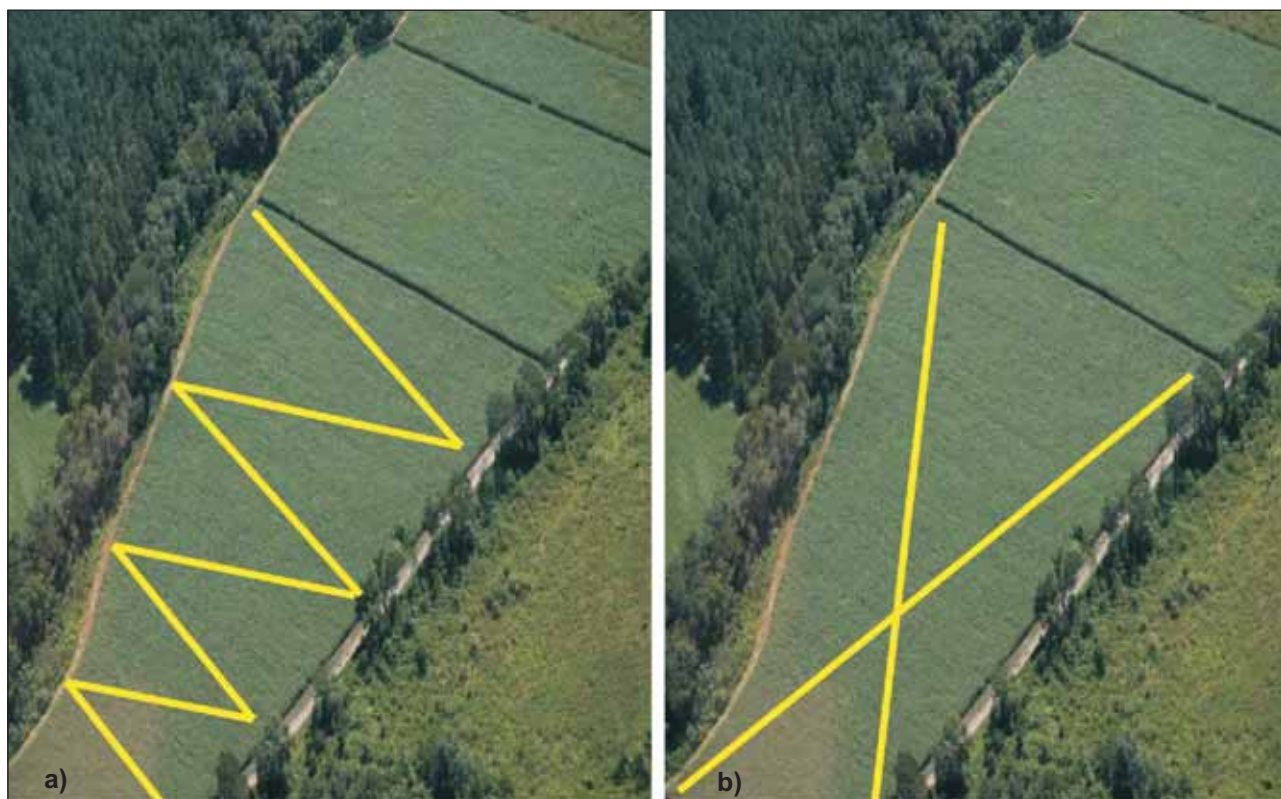
## **5. Evaluación de resultados y preparación de informes**

Las membranas se analizan bajo lupa binocular y se consideran positivas aquellas impresiones cuyos haces vasculares se encuentran coloreados (Fig. 3e). Los resultados se informan por escrito en el libro foliado y luego mediante un informe confidencial que se entrega al solicitante del servicio. Los códigos de las muestras, los responsables de cada etapa del diagnóstico (recepción de las muestras, siembra de las membranas, revelado y análisis de los resultados), los protocolos utilizados y los resultados obtenidos se registran en el libro foliado. Se realiza una fiscalización periódica, efectuada por los técnicos responsables del diagnóstico, lo que garantiza la confidencialidad y trazabilidad de todo el proceso.

## **Logros recientes**

Reconociendo la importancia que tiene el aspecto sanitario en un programa de producción de semilla de caña de azúcar de alta calidad como el que lleva adelante la EEAOC, una de las principales metas de la Sección Fitopatología es dar respuesta a la problemática sanitaria de los cañaverales de la provincia de Tucumán. La capacidad operativa de





**Figura 2. Modalidad de muestreo a campo sugerida para el diagnóstico de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar. a. Muestreo en zig-zag. b. Muestreo con trazado de transectas. (Fuente de fotografía: Sección Sensores remotos y SIG-EEAOC).**

nuestro laboratorio aumentó notablemente a partir de 2008 (Tabla 1), acompañando el crecimiento del Proyecto Vitroplantas.

#### En resumen, desde 2008 se logró:

- Triplicar la capacidad operativa del laboratorio, logrando en 2009 establecer una capacidad de procesamiento mayor a la demanda, en comparación a la capacidad de procesamiento de la campaña 2007.

- Incorporar el procesamiento de muestras provenientes de semilleros Certificados, con el objetivo de que en los próximos años estos sean muestreados en mayor proporción.

- Agilizar los tiempos de procesamiento entregando los resultados de los análisis dentro de la semana de recepción de las muestras, otorgando una herramienta útil e importante en la planificación anticipada de la plantación de los cañaverales.

**Tabla 1. Capacidad operativa del Laboratorio de la Sección Fitopatología de la EEAOC para el diagnóstico serológico de enfermedades sistémicas en semilleros de caña de azúcar del Proyecto Vitroplantas**

Número de muestras	2007	2008	2009
Cupo diario de recepción	Hasta 15	45	Sin restricciones
Procesamiento máximo diario	15	40	50
Semillero Básico	1008 <sup>1</sup>	1089 <sup>2</sup>	1624 <sup>3</sup>
Semilleros Registrados <sup>4</sup>	137	144	160
Semilleros Certificados <sup>4</sup>	n/d	469	424

<sup>1</sup> Para 2007 las muestras fueron de 1 tallo por surco

<sup>2</sup> Para 2008 las muestras fueron de 3 tallos por surco

<sup>3</sup> Para 2009 las muestras fueron de 4 tallos por surco

<sup>4</sup> Para todos los años las muestras de los semilleros Registrados y Certificados fueron de 20 tallos cortados al azar de una o tres hectáreas, respectivamente



**Figura 3: Procesamiento de muestras de caña de azúcar previo al análisis serológico por medio de la técnica inmunoenzimática de impresión de tejidos.**

**a. Recepción y codificación de muestras en invernáculo. b. Extracción del cilindro central del tallo con sacabocado. c. Acondicionamiento de muestras para su procesamiento en el laboratorio. d. Impresión del cilindro en la membrana de nitrocelulosa. e. Visualización de la reacción Antígeno-Anticuerpo (positiva) por coloración de los haces vasculares colonizados.**

Los logros alcanzados hasta el presente fueron posibles gracias a la implementación de un intenso proceso de planificación y gestión, sustentado en el marcado compromiso de los recursos humanos involucrados

en las diferentes etapas del Proyecto Vitroplantas. Este proyecto se renueva constantemente a la luz de nuevos objetivos y metas conducentes a fortalecer al principal sector agroindustrial de la provincia de Tucumán.





## Bibliografía citada

**Conci, V., Lenardón, S., Giolitti, F., Cafrune, E., Perotto, C., y de Breuil, S. 2008.** Técnicas serológicas. III Curso internacional sobre caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas. IFFIVE-INTA. Córdoba, Argentina.

**Cuenya, M.I., García, M.B., Díaz Romero, C., Ostengo, S., Costilla, D., y Romero, E.R. 2007.** Efectos de la calidad de la caña semilla en los componentes del rendimiento cultural de las variedades CP65-357 y LCP85-384 (*Saccharum* spp.) según diferentes edades de corte (Parte 1). Rev. Ind. Agríc. Tucumán. 84 (1): 9-14.

**Grisham, M. P. 1991.** Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple-year plantings. Phytopathology. 81: 337-340.

**Guzmán, M. L. y Victoria K., J. I. 2001.** Evaluación de cinco enfermedades de la caña de azúcar mediante las técnicas de “dot-blot” y “tissue-blot” a partir de la misma muestra de tejido. Fitopatología Colombiana. 25 (2): 103-110.

**Rago, A., Acreche, M., Sopena, R., and Mariotti, J.A. 2004.** A survey of ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) in commercial sugar cane fields of Tucuman (Argentina). Sugar Cane International 22 (6):12-14.

**Viruel, E. 2006.** Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar: ajuste metodológico y aplicaciones. Trabajo final para obtener el título de Licenciado en Biotecnología. Universidad Nacional de Tucumán. Fac. de Bioquímica, Química y Farmacia. 76 pp.

---

# Evolución del estado sanitario de los semilleros Básico y Registrados provenientes de caña semilla micropropagada en la provincia de Tucumán

Patricia A. Digonzelli, Juan Giardina, Claudia Funes, Silvina L. Giammaria, Ernesto Chavanne y Jacqueline Ramallo

## Introducción

A partir de 2001 la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) implementó el Proyecto Vitroplantas con el objetivo de producir caña semilla de alta calidad con identidad genética, sanidad y vigor garantizados.

En el marco de este proyecto la semilla de alta calidad se obtiene empleando las técnicas de cultivo de meristemas y micropropagación, y se la multiplica en el campo mediante un esquema de semilleros: Básico, Registrados y Certificados (Digonzelli *et al.*, 2005). La combinación del cultivo de meristemas y de la micropropagación permite obtener caña semilla de elevada pureza genética, sanidad y vigor, razón por la cual su uso se ha difundido en muchos países cañeros (Pérez Ponce, 1998; Hoy y Flynn, 2001; Glyn, 2005; Guevara y Ovalle, 2005).

El estado sanitario del material de propagación constituye un aspecto fundamental que hace a la calidad de la caña semilla, especialmente en relación a enfermedades sistémicas de gran incidencia en la productividad de los cañaverales como el mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus* y *Sorghum mosaic virus*), la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), el carbón (*Ustilago scitaminea*) y el raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) o RSD, por sus siglas en inglés.

El raquitismo de la caña soca o RSD es una de las enfermedades más importantes en todas las zonas cañeras del mundo y puede ocasionar pérdidas de producción superiores al 50%, dependiendo de la variedad, las condiciones ambientales y la presencia de otros patógenos (Victoria *et al.*, 1995; Glyn, 1997; Glyn, 2005). Esta enfermedad se caracteriza por no presentar síntomas visibles y por difundirse principalmente a través del empleo de caña semilla enferma.

Actualmente, el control del RSD se realiza mediante la producción de semilla saneada multiplica-

da en lotes semilleros que conservan los estándares de calidad (Cassalett Dávila, *et al.*, 1995).

Los esquemas de multiplicación en semilleros varían en los diferentes países productores de caña de azúcar, pero el objetivo final es el mismo: **incrementar el volumen disponible de caña semilla saneada, vigorosa y con identidad genética garantizada.**

Las variedades de caña de azúcar empleadas en Tucumán son susceptibles al RSD y los cañaverales comerciales obtenidos a partir de semilla no saneada presentan altos niveles de incidencia de la enfermedad (Rago *et al.*, 2004). Por este motivo, la implementación de un programa de producción de caña semilla de alta calidad y de un esquema de semilleros para su posterior multiplicación resulta imprescindible para incrementar la productividad de los cañaverales.

En el Proyecto Vitroplantas el semillero Básico se implanta con los plantines micropropagados obtenidos en el laboratorio y aclimatados en invernáculo (primera etapa de multiplicación en campo de la semilla de alta calidad). Con la "caña semilla" de este semillero se establecen los semilleros Registrados en lotes de ingenios, cooperativas y productores (segunda etapa de multiplicación en campo). A partir de esta semilla se plantan los semilleros Certificados (tercera etapa de multiplicación en campo), los cuales proveen la "caña semilla" para las plantaciones y/o renovaciones comerciales.

El monitoreo sanitario de la "caña semilla" en todas las etapas de semilleros y en los lotes comerciales es una herramienta esencial para asegurar la calidad de la simiente y evaluar el funcionamiento del esquema de multiplicación de la misma, así como su impacto en la producción comercial. Además, constituye el criterio fundamental para permitir o no la permanencia de un lote dentro del esquema de semilleros.

En el presente artículo se analiza la evolución del estado sanitario de los semilleros Básico y Registrados durante el período 2005-2010.

## 2.- Evaluaciones sanitarias

Todos los años, en los meses de abril y mayo se realiza la toma de muestras en el semillero Básico y en los semilleros Registrados para determinar la incidencia de RSD y de escaldadura de la hoja. El muestreo se efectúa con gran intensidad y extremando las precauciones para lograr resultados altamente confiables.

El semillero Básico se muestrea tomando al azar tres tallos por surco o por línea (se entiende por línea a todos los plantines derivados del mismo meristema apical de la planta donante). Así, en caso de haber más de una línea en un surco se toma una muestra por cada una de ellas. Si una línea ocupa más de un surco se toma una muestra por cada surco y/o fracción de surco que ocupa la línea.

Los semilleros Registrados se muestrean con una intensidad de una muestra de 20 tallos por cada hectárea o fracción siempre de igual variedad, edad, manejo, etc.

En todos los casos el muestreo se realiza tomando los tallos al azar dentro del lote (se cruza el lote en diagonal o en zig-zag para aleatorizar el muestreo) y se toma solo un tallo de la misma cepa.

Las muestras se llevan a la Sección Fitopatología de la EEAOC donde se determina la presencia de RSD y escaldadura de la hoja usando técnicas serológicas (ensayo inmunoenzimático de impresión de tejidos o TBIA, por sus siglas en inglés).

En todos los casos las muestras se ingresan codificadas (muestras ciegas) al laboratorio y una vez procesadas son decodificadas y se calcula el porcentaje de incidencia de ambas enfermedades, el cual se determina como el número de tallos enfermos en relación al número total de tallos. Este cálculo se realiza para cada variedad y cada lote semillero en forma individual.

El muestreo de los semilleros Básico y Registrados es realizado por técnicos de la EEAOC y los resultados que se presentan en este artículo corresponden a los últimos seis años (2005-2010).

### 2.1- Evolución del estado sanitario del semillero Básico

Los análisis sanitarios del semillero Básico indicaron que las líneas de las diferentes variedades se encontraron libres (0% de incidencia) de escaldadura de la hoja y RSD en los años considerados (Tabla 1).

### 2.2.- Evolución del estado sanitario de los semilleros Registrados

En la Tabla 2 se indica el número de muestras tomadas en los semilleros Registrados durante el período 2005-2010.

**Tabla 1. Estado sanitario del semillero Básico durante el período 2005-2010.**

Variedad	Porcentaje de incidencia	
	RSD	Escaldadura de la hoja
TUCCP 77-42	0	0
LCP 85-384	0	0
CP 65-357	0	0
RA 87-3	0	0
L 75-33	0	0
TUC 95-37	0	0
TUC 97-8	0	0

**Tabla 2. Número de muestras tomadas en los semilleros Registrados durante el período 2005-2010.**

Año	Número de muestras
2005	153
2006	142
2007	137
2008	144
2009	155
2010	235
<b>TOTAL</b>	<b>966</b>

#### 2.2.1- Evaluación de la incidencia de escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*):

La evaluación de la incidencia de escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) en los semilleros Registrados se inició en el año 2006. La incidencia promedio de esta enfermedad ponderada según el número de surcos, considerando todas las variedades y todos los lotes semilleros fue para el año 2006 de 0,1%. En los años 2007 y 2008 todos los semilleros Registrados se encontraron libres de la enfermedad (0% de incidencia). En el 2009 la incidencia fue de 0,1% y en el 2010 de 1,4%.

En todas las situaciones analizadas en este artículo se utiliza la incidencia ponderada según el número de surcos, porque permite expresar la real dimensión que tienen las enfermedades en los semilleros.

El porcentaje de incidencia de escaldadura de la hoja en los semilleros Registrados fue discriminado por variedad para las campañas 2006, 2009 y 2010. La incidencia media de la enfermedad ponderada según el número de surcos de cada variedad considerando todos los lotes semilleros fue, para el año 2006, del 0,6% para CP 65-357 y LCP 85-376,



mientras que TUCCP 77-42, LCP 85-384, RA 87-3 y L 75-33 se encontraban libres de la enfermedad.

En el 2009 la incidencia promedio fue de: 0,1% en RA 87-3, 0,07% en TUCCP 77-42, 0,8% en CP 65-357 y 1,3% en L 75-33. En el año 2010 hubo mayor incidencia de escaldadura que en años anteriores. Así, se presentaron porcentajes promedios de incidencia de: 1,1%; 2,2%; 1,4%; 3%; 1,2%; 0,7% y 1,9% en LCP 85-384, RA 87-3, TUCCP 77-42, CP 65-357, TUC 97-8, TUC 95-37 y L 75-33, respectivamente. El mayor nivel de incidencia de la enfermedad se registró en CP 65-357 evidenciándose los problemas sanitarios propios de este cultivar.

LCP 85-376 y TUCCP 77-42 son susceptibles a escaldadura, CP 65-357 y TUC 97-8 están catalogadas como moderadamente susceptibles, RA 87-3 y TUC 95-37 son moderadamente resistentes a la enfermedad, mientras que LCP 85-384 es resistente a escaldadura.

### 2.2.2.- Raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*):

La Figura 1 muestra la evolución de los niveles de incidencia de RSD en los semilleros Registrados durante el período 2005-2010. El valor presentado corresponde a la incidencia promedio ponderada según el número de surcos, considerando todas las variedades y todos los lotes semilleros.

La figura evidencia el excelente estado sanitario que presentan los semilleros Registrados y su evolución positiva en el transcurso de los años. En un período de 6 años la incidencia promedio ponderada de

RSD se redujo del 6,75% al 0,65%. Este último valor de incidencia es inferior a los umbrales de tolerancia para esta enfermedad aceptados en diferentes países cañeros del mundo en esta etapa de semilleros. Se debe aclarar que muchos de estos países llevan más de 20 años de trabajo continuo dentro de un esquema de multiplicación de caña semilla de alta calidad y presentan niveles de RSD en sus campos comerciales que no superan el 5%, situación diametralmente opuesta a la de Tucumán donde los campos comerciales presentan una incidencia general promedio de la enfermedad del 40% (Rago *et al.*, 2004).

En la Tabla 3 se presenta el número de surcos implantados con las diferentes variedades en los semilleros Registrados para el período 2005-2010.

A continuación, en la Figura 2, se muestra el porcentaje de incidencia de RSD discriminado por variedad para el año 2005. Los valores presentados corresponden a la incidencia promedio de la enfermedad ponderada según el número de surcos de cada variedad, considerando todos los lotes semilleros.

Para la campaña 2005 los mayores niveles de incidencia de RSD correspondieron a las variedades RA 87-3 y CP 65-357 con valores promedio de 9,47% y 7,95%, respectivamente. LCP 85-384, TUCCP 77-42 y LCP 85-376 presentaron niveles de incidencia muy similares entre sí (6%).

En la campaña 2006 el nivel general de incidencia de RSD en los semilleros Registrados se redujo del 6,75% al 0,85%, lo que representa una incidencia 8 veces menor respecto al 2005. Esta disminución está relacionada, entre otros motivos, a un manejo más efi-

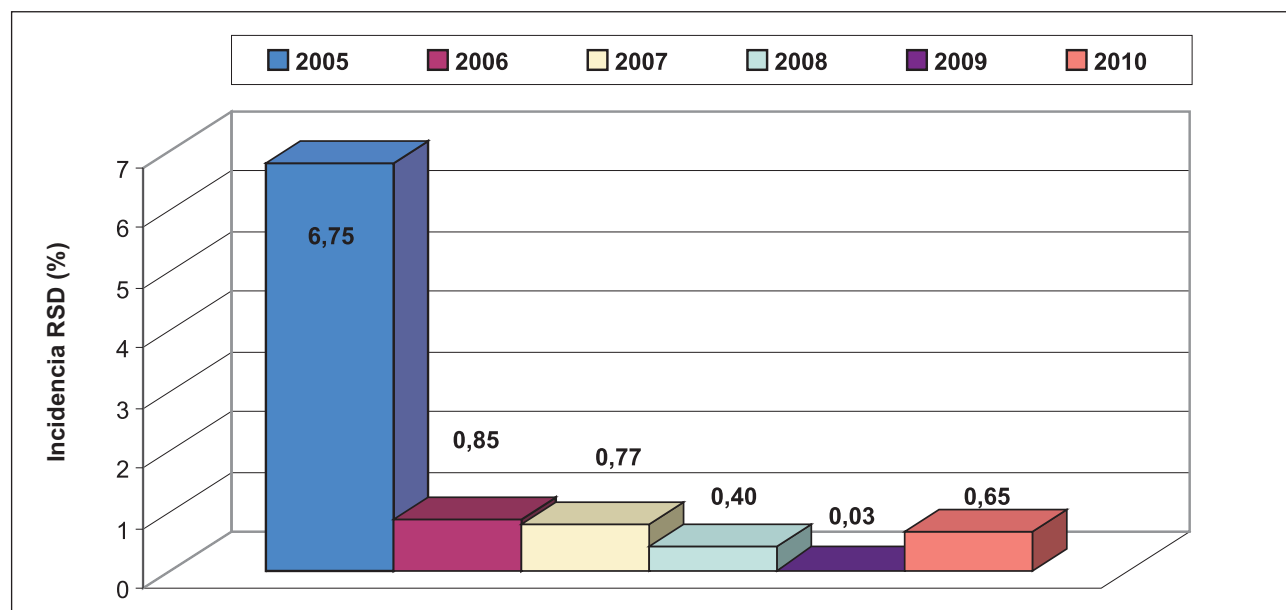
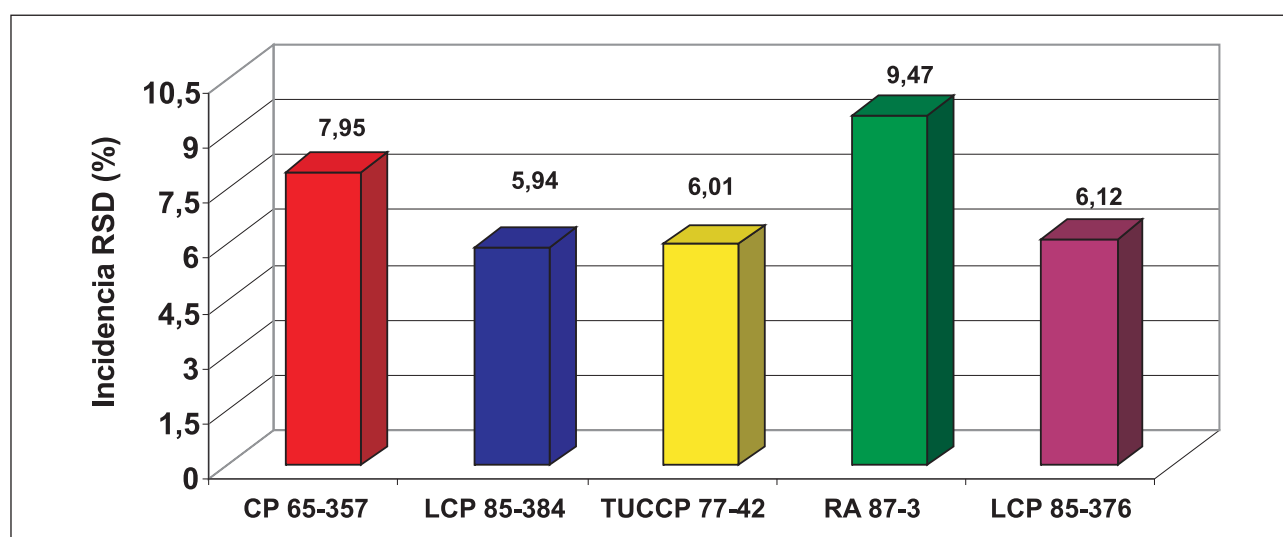


Figura 1. Porcentaje de incidencia de RSD en los semilleros Registrados en el período 2005-2010. Promedio general ponderado por el número de surcos.

**Tabla 3. Surcos de cada variedad en los semilleros Registrados. Tucumán, 2005-2010.**

Variedad	Número de surcos en los semilleros Registrados						TOTAL
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	
TUCCP 77-42	869,0	1061,0	953,3	646,0	857,2	1518,4	5904,4
LCP 85-384	9291,6	3295,0	1855,9	3465,4	4782,2	4877,4	42010,0
CP 65-357	3035,1	1298,0	-----	40,5	341,9	456,4	5171,9
RA 87-3	1631,8	2349,0	2767,4	1624,4	1353,9	1323,9	11050,4
L 75-33	-----	258,0	622,5	436,0	156,5	209,5	1682,5
LCP 85-376	485,8	153,0	-----	-----	-----	-----	638,8
TUC 95-37	-----	-----	-----	-----	-----	482,0	482,0
TUC 97-8	-----	-----	-----	-----	-----	338,0	338,0
<b>TOTAL</b>	<b>15313,3</b>	<b>8414,0</b>	<b>6199,1</b>	<b>6212,3</b>	<b>7491,7</b>	<b>9205,6</b>	<b>67224,0</b>



**Figura 2. Incidencia de RSD por variedad en semilleros Registrados. Promedio ponderado por el número de surcos de cada variedad. Tucumán, 2005.**

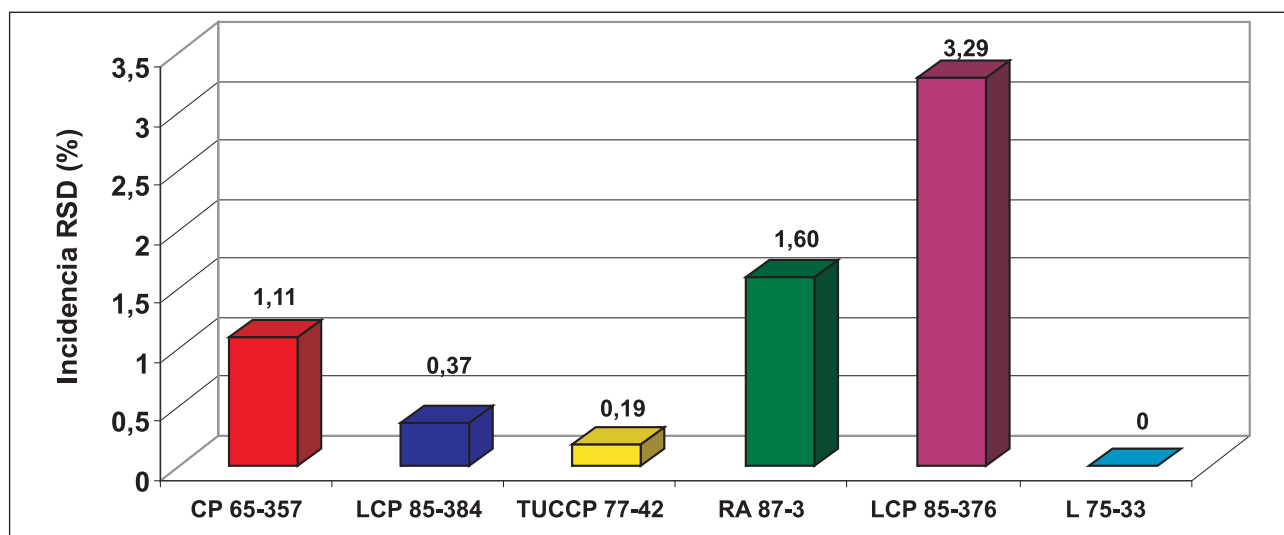
ciente de los semilleros. Las variedades que presentaron los mayores niveles de incidencia fueron: LCP 85-376 (3,29%), RA 87-3 (1,60%) y CP 65-357 (1,11%). LCP 85-384 y TUCCP 77-42 tuvieron niveles de incidencia inferiores al 0,4%, mientras que L 75-33 se encontró libre (0%) de RSD (Figura 3).

En el año 2007 los niveles de incidencia de RSD se redujeron aproximadamente un 10% respecto al año anterior, pasando de 0,85% a 0,77% (Figura 1). En estos semilleros no se incluyeron LCP 85-376 ni CP 65-357, debido a la poca demanda de estas variedades por parte de los productores cañeros. LCP 85-376 no se adaptó a las condiciones de Tucumán y CP 65-357 fue reemplazada por LCP 85-384 debido, entre otros motivos, a su alta susceptibilidad al RSD, lo que afectó negativamente su producción comercial. Sin embargo, la variedad CP 65-

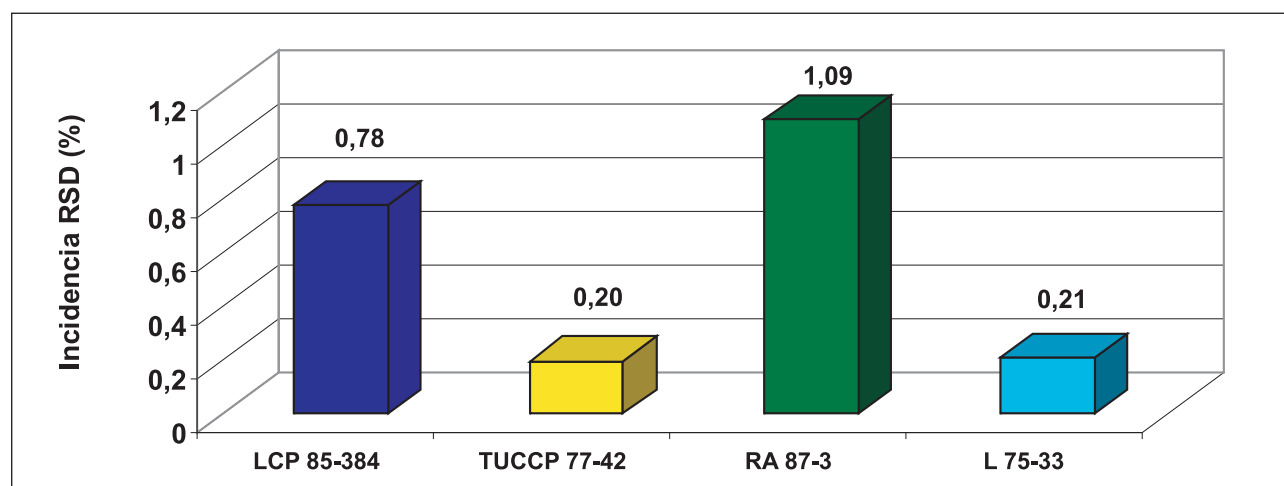
357 saneada y con un manejo apropiado para evitar su rápida reinfección con el agente causal del RSD puede ser todavía una alternativa válida para diversificar el espectro varietal de Tucumán. RA 87-3 presentó el mayor nivel de incidencia de la enfermedad (1,09%), seguida de LCP 85-384 (0,78%), mientras que TUCCP 77-42 y L 75-33 presentaron niveles de incidencia del 0,20%.

En 2008 la incidencia general promedio de RSD en los semilleros Registrados se redujo en aproximadamente el 50%, respecto de 2007, pasando de 0,77% a 0,40%. En este año se dispuso de una pequeña cantidad de semilla de CP 65-357, en edad de caña planta, la cual se encontró libre de RSD. La caña semilla de TUCCP 77-42 y L 75-33 también estuvo libre de RSD tanto en edad de caña planta como soca 1.





**Figura 3. Incidençia de RSD por variedad en semilleros Registrados. Promedio ponderado por el número de surcos de cada variedad. Tucumán, 2006.**



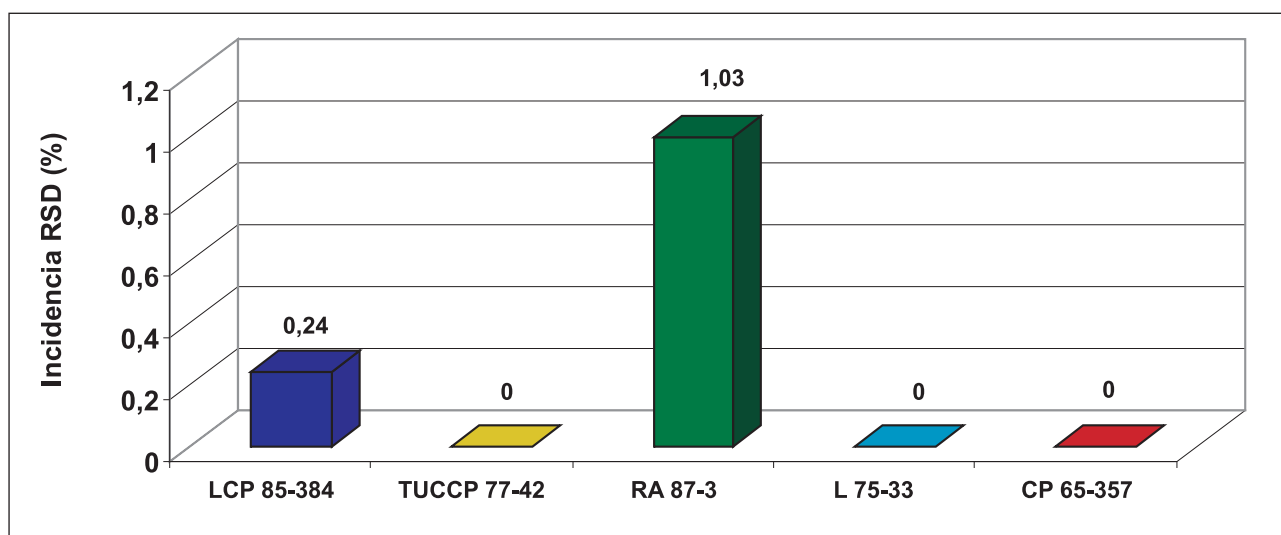
**Figura 4. Incidençia de RSD por variedad en semilleros Registrados. Promedio ponderado por el número de surcos de cada variedad. Tucumán, 2007.**

RA 87-3 presentó la mayor incidencia de RSD (1,03%) y LCP 85-384 presentó muy bajos niveles de incidencia de la enfermedad (0,24%) (Figura 5).

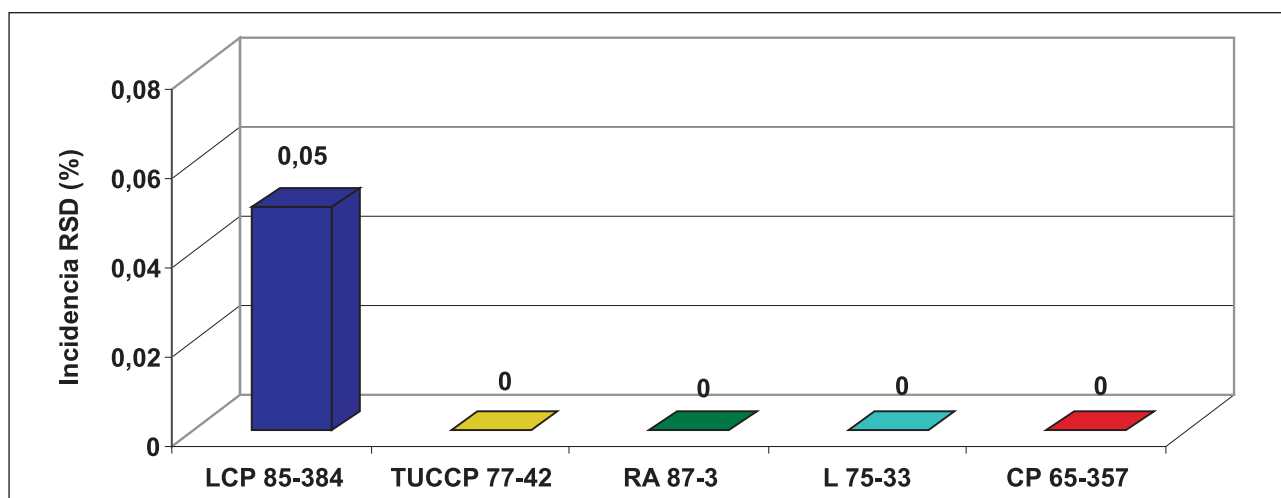
En el año 2009 el estado sanitario de los semilleros Registrados fue excelente con una incidencia promedio de RSD de 0,03%, lo cual es un valor realmente óptimo. La figura 6 pone en evidencia esta situación, ya que como se observa en la misma, solo en LCP 85-384 se observó presencia de la enfermedad y en niveles muy bajos. Las demás variedades se encontraban libres de RSD.

En el año 2010 el nivel de incidencia de RSD en los semilleros Registrados aumentó en relación al observado en el año 2009, con un valor de 0,65% (Figura 7). Si bien esta incidencia de la enfermedad es baja y puede considerarse un nivel muy aceptable

de sanidad en los semilleros. El incremento de la incidencia de RSD en los lotes semilleros respecto al año 2009 está probablemente relacionado con el hecho de que debido a las heladas varios semilleros fueron cosechados con máquinas integrales, lo que puede haber sido la causa de la reinfección con RSD. Por lo tanto, es muy importante no descuidar la desinfección de las cosechadoras integrales ya que constituyen una fuente importante de difusión de la enfermedad, especialmente si se considera el elevado nivel de incidencia de RSD que tienen muchos lotes comerciales en la provincia. En este año la mayor incidencia de la enfermedad se observó en RA 87-3 (1,4%), seguida por CP 65-357 (1%), las demás variedades presentaron valores de incidencia entre 0,4% y 0,6%).



**Figura 5. Incidencia de RSD por variedad en semilleros Registrados. Promedio ponderado por el número de surcos de cada variedad. Tucumán, 2008.**



**Figura 6. Incidencia de RSD por variedad en semilleros Registrados. Promedio ponderado por el número de surcos de cada variedad. Tucumán 2009.**

### Consideraciones finales

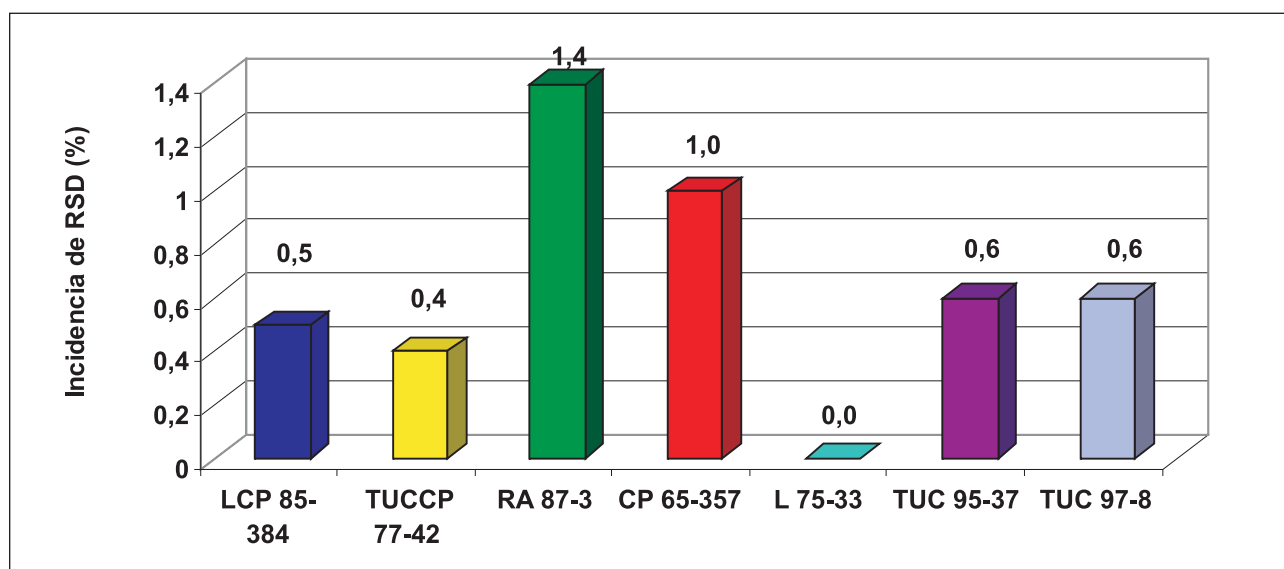
Los valores de incidencia de RSD y escaldadura de la hoja en los semilleros, mostrados en este informe, expresan claramente la eficiencia del esquema de producción y multiplicación de caña semilla de alta calidad implementado en el Proyecto Vitroplantas. Los estándares de calidad alcanzados en los semilleros Básico y Registrados resultan altamente significativos.

Además, es posible observar diferente comportamiento entre las variedades en relación a la reinfección con el agente causal del RSD. Así, en nuestra experiencia, las variedades RA 87-3 y CP 65-357 resultan más susceptibles a la reinfección que

TUCCP 77-42 y LCP 85-384, por lo cual es necesario extremar las precauciones al multiplicar semilla de estas variedades.

Por otra parte, muestreos realizados por los productores sobre semilleros certificados y lotes comerciales plantados con material proveniente del Proyecto Vitroplantas, en los departamentos de Cruz Alta, Leales, Burruyacú y Lules mostraron bajos niveles de incidencia de RSD (aproximadamente 4%). Cabe aclarar que debido al número insuficiente de muestras y a la distribución del muestreo, no es posible generalizar estos resultados a toda el área cañera, sin embargo indican la factibilidad de lograr lotes de buena sanidad.





**Figura7. Incidencia de RSD por variedad en semilleros Registrados. Promedio ponderado por el número de surcos de cada variedad. Tucumán, 2010.**

#### **Bibliografía citada**

**Cassalett Dávila, C.; J. Torres Aguas y C. Echeverri. 1995.** El cultivo de la caña de azúcar en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia), Cali, Colombia.

**Digonzelli, P.; E. Brito; J. Giardina; J. Scandaliaris y E. Romero. 2005.** Caña semilla de alta calidad: insumo vital para mejorar la productividad de los cañaverales tucumanos. Avance Agroind. 26 (2): 13-16.

**Glyn, L. 1997.** A review of ratoon stunting disease. Sugarcane N° 4: 9-14.

**Glyn, L. 2005.** Pests and diseases of sugarcane. Sugar Cane Int. 23 (1): 3-14.

**Guevara, L. and W. Ovalle. 2005.** Effect of treatments to eliminate systemic pathogens from sugarcane setts. En: Proc. ISSCT Congress, 25, Guatemala, pp. 623-628.

**Hoy, J. and J. Flynn. 2001.** Control of ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with seedcane produced through micropropagation and resistant cultivars. En: Proc. ISSCT Congress, 24, Brisbane, Australia, pp. 417-421.

**Pérez Ponce, J. N. 1998.** Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. 390 pp.

**Rago, A.; Acreche, M.; Sopena, R. y Mariotti, J. 2004.** A Survey of ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) in commercial sugarcane fields at Tucumán (Argentina). Sugar Cane International 22 (6):12-14.

**Victoria, J.; Guzmán, M.; Angel, J. y Ochoa, O. 1995.** Caña de Azúcar: El Raquitismo. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Proyecto SICA. Baco. Mundial. 3 pp.



# Glosario

**Ácidos nucleicos:** polímeros formados por cadenas de nucleótidos unidos por uniones fosfodiéster. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Están presentes en todas las células y constituyen la base material de la herencia que se transmite de una a otra generación.

**Aclimatación o rusticación:** proceso de adaptación de las pequeñas plántulas mantenidas *in vitro* a condiciones de invernadero para su posterior traslado a campo.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria.

**AFLPs:** siglas en inglés de “Amplified fragment length polymorphism PCR”. Es una técnica que permite generar marcadores moleculares y está basada en la digestión con enzimas de restricción y posterior amplificación por PCR.

**Anticuerpo:** sustancia defensora (proteína) sintetizada por el sistema inmunológico como respuesta a la presencia de una proteína extraña (antígeno) que el anticuerpo neutraliza.

**Anticuerpo monoclonal:** anticuerpo monoclonado a partir del cultivo de un único tipo de células (un clon de hibridoma) y que contiene por lo tanto un sólo tipo de proteínas (inmunoglobulinas).

**Antígeno:** sustancia extraña a un organismo, normalmente una proteína, que desencadena como reacción defensiva la formación de anticuerpos que reaccionan específicamente con el antígeno. En general un antígeno es cualquier sustancia que provoca una respuesta inmune.

**ARN:** ácido ribonucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es ribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, uracilo, citosina y guanina. Actúa como intermediario y complemento de las instrucciones genéticas

codificadas en el ADN. Existen varios tipos diferentes de ARN relacionados con la síntesis de proteínas. Así, existe ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y un ARN heterogéneo nuclear (ARNhn). El ARN es normalmente el producto de la transcripción de un molde de ADN.

**Autótrofo:** organismo capaz de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas.

**Bacterias:** organismos generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistas inferiores. Son células procariotas, es decir que su núcleo está formado por un único cromosoma y carecen de membrana nuclear.

**Barbecho:** tierra que no se siembra durante uno o varios ciclos vegetativos con el propósito de recuperar y almacenar materia orgánica y humedad.

**Caña planta:** primer ciclo de crecimiento de la caña de azúcar luego de su plantación.

**Caña semilla:** trozo de tallo (estaca) de la caña de azúcar que se emplea para la multiplicación comercial de esta especie (reproducción agámica).

**Caña Soca:** sucesivos ciclos de crecimiento de la caña de azúcar después de la cosecha de la caña planta.

**Cebador:** secuencia corta de ADN que se aparea a una cadena simple de ácido nucleico y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

**Cepa:** base subterránea del tronco o del tallo de una planta vivaz, unida directamente a la raíz.

**Cera cuticular:** sustancias que recubren los órganos externos de algunas plantas; están asociadas a las membranas celulares cutinizadas y suberificadas.

**Citoquininas:** grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular.



**Compuestos fenólicos:** Compuestos orgánicos producto del metabolismo secundario normal de las plantas. Algunos son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.).

**Clon:** grupo de células o de organismos de idéntica constitución genética entre sí y con el antepasado común del que proceden por división binaria o por reproducción asexual.

**Cultivar:** Variedad de planta cultivada. De forma abreviada se escribe "cv".

**Cultivo *in vitro* de tejidos:** Conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales y en condiciones controladas.

**Cultivo de meristemas:** técnica de cultivo de tejidos que consiste en aislar el meristema y sembrarlo en un medio adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa.

**Cutícula:** Película externa de la epidermis que la recubre por completo y de manera ininterrumpida.

**Deshijado:** separación de los macollos o vástagos formados a partir del tallo original de cada plantín. Esta práctica se realiza en la etapa de crianza en invernáculo para incrementar el número de plantines.

**Diagnóstico molecular:** diagnóstico basado en el estudio del ADN mediante el cual se logra la localización e identificación de un determinado gen.

**Estoma:** abertura diminuta que aparece en la epidermis de los órganos verdes de las plantas superiores, con capacidad de regular su grado de apertura y a través de la cual se lleva a cabo el intercambio gaseoso.

**Explantó:** porción de tejido u órgano que se separa de la planta para iniciar el cultivo *in vitro*.

**Electroforesis:** técnica que permite la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico.

**ELISA:** del inglés "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay", (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción

cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

**Enfermedades sistémicas:** grupo de enfermedades en las que el patógeno invade todos los tejidos de la planta, inclusive las yemas.

**Fitohormonas:** sustancias que regulan los fenómenos fisiológicos de las plantas. Actúan a bajas concentraciones e interactúan unas con otras. Están presentes en la planta durante todo su ciclo de vida pero su concentración fluctúa. Controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación.

**Gen:** unidad física y funcional del material hereditario que determina un carácter del individuo y que se transmite de generación en generación. Su base material la constituye una porción de cromosoma (locus) que codifica la información mediante secuencias de ADN.

**Genoma:** todo el material genético almacenado en el conjunto del ADN o en los cromosomas de un organismo en particular.

**Genotipo:** contenido genético de un individuo o, dicho de otro modo, conjunto de genes de un organismo.

**Germoplasma:** conjunto de genes que se transmite en la reproducción a la descendencia por medio de gametos o células reproductoras. El concepto de germoplasma se utiliza comúnmente para designar el genoma de las especies vegetales silvestres y no genéticamente modificadas de interés para la agricultura.

**Heterótrofo:** organismo incapaz de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas, por lo que debe nutrirse de otros seres vivos.

**Hidrotermoterapia:** tratamiento de inmersión de material vegetal en agua caliente para eliminar patógenos vegetales.

**Herencia cuantitativa:** se refiere a caracteres cuya expresión está regulada por un número grande de genes y cada gen tiene varias formas (alelos).

**Herencia simple:** se refiere a caracteres que se heredan en forma simple, es decir, su expresión es regulada por uno o pocos genes.

**Línea:** todos los plantines obtenidos *in vitro* a partir de un mismo meristema apical de la planta madre.

**Macollaje:** proceso de formación de macollos o hijuelos.

**Macollo:** conjunto de vástagos nacidos de la base de un mismo pie, especialmente tratándose de gramíneas.

**Marcadores moleculares:** son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Pueden ser proteínas (antígenos e isoenzimas), DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida).

**Meristemas:** fragmentos de tejidos vegetales que poseen un tamaño de 0,1 a 0,5 mm y se encuentran en activa división celular y son responsables del crecimiento vegetal.

**Micropropagación:** conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en condiciones controladas, en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

**Pares de bases:** consiste en dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno. En el ADN adenina y timina así como guanina y citosina, pueden formar un par de bases. En ARN, la timina es reemplazada por el uracilo, conectándose este con la adenosina.

**PCR:** por su sigla en inglés Polymerase Chain Reaction. Es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.

**Planta madre o donante:** planta de la cual se toma el explanto para iniciar un proceso de cultivo de tejidos.

**Plantín:** planta pequeña de caña de azúcar obtenida en laboratorio y trasplantada en invernáculo para su aclimatación y crianza.

**RAPD:** siglas en inglés de "Randomly amplified polymorphic DNA", es una técnica para detectar polimorfismos mediante la amplificación por PCR de regiones desconocidas de ADN mediante el empleo de cebadores arbitrarios.

**Retrotranscripción:** también llamada transcripción inversa, es la síntesis de ADN de doble cadena utili-

zando como molde ARN monocatenario.

**Reproducción agámica:** reproducción que ocurre sin intervención de gametos.

**Semillero Básico:** primera etapa de multiplicación en campo de los plantines obtenidos en el laboratorio, mediante cultivo de meristemas y micropropagación, y aclimatados en invernáculos.

**Semillero Registrado:** segunda etapa de multiplicación en campo de la caña semilla de alta calidad. Se implantan con la semilla proveniente del semillero Básico.

**Semillero Certificado:** tercera etapa de multiplicación en campo de la caña semilla de alta calidad. Se implantan con la semilla proveniente de los semilleros Registrados.

**Tejido vascular:** también llamado tejido de conducción, está formado por el xilema y el floema que son los encargados de conducir agua, sales y nutrientes.

**Totipotencia:** capacidad de regeneración de una planta completa a partir de una célula o un grupo de células.

**Trazabilidad:** procedimientos preestablecidos que permiten conocer el origen, historia, ubicación, y trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de toda la cadena, en un momento dado.

**Troceado:** práctica agronómica que consiste en cortar el tallo de la caña de azúcar (caña semilla) en estacas con 3-5 yemas con la finalidad de romper la dominancia apical.

**Variación somaclonal:** modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *in vitro*. Muchas de estas modificaciones son heredables a la progenie de las plantas regeneradas.

**Vitroplantas:** pequeñas plantas cultivadas *in vitro* en un medio nutritivo artificial, en condiciones de esterilidad y en un ambiente controlado.

**Virus:** entidad biológica que para propagarse necesita de una célula huésped. Cada partícula de virus o virión es un agente potencialmente patógeno compuesto por una cápside (o cápsida) de proteínas que envuelve al ácido nucleico, que puede ser ADN o ARN.





# Vitroplantas Project: production of high quality seedcane

---

---

Limited availability of high quality seedcane, that is to say, vigorous and healthy seedcane with guaranteed genetic identity, has discouraged attempts to increase sugarcane crop productivity for years. As a consequence, Obispo Colombres Agroindustrial Experiment Station (EEAOC) created a project around years 2000 and 2001 to produce and make high quality seedcane available for cane growers.

Since its beginnings, the project represented a major challenge and entailed commitment on the part of the institution and its technicians to generate and introduce technological advances into sugarcane production.

Vitroplantas Project is based on the production of high quality seedcane through meristem culture techniques and micropropagation. These methods allow producing a great number of vigorous seedlings, which are free from pathogens and identical to mother plants (plants from which they were obtained).

Seedlings obtained in the lab through the above mentioned techniques are acclimatized in greenhouses and later planted in nursery fields.

Nurseries are plots especially allotted to the reproduction of high quality seedcane. In Vitroplantas Project, the proposed nursery scheme consists of three stages for high quality seedcane multiplication: a Basic Nursery and Registered and Certified Nurseries. The Basic Nursery is planted with micropropagated seedlings. The seedcane produced there is used to plant Registered Nurseries, which in turn provide material for Certified Nurseries. Finally, these nurseries produce seedcane with which commercial fields are planted.


One of the outstanding features of the project is that it implies a good deal of interaction with growers. The EEAOC is exclusively responsible for in vitro plant production and the Basic Nursery, but Registered Nurseries are planted in fields of sugar factories, farmer cooperatives and individual growers, so responsibility lies on them. Nonetheless, they

receive agronomic assessment and phytosanitary control support from EEAOC technicians, who take part in nursery plantation and later visit plots every 20 days. Sugar factories, farmer cooperatives and individual growers are also responsible for Certified Nurseries planted in their fields, but the EEAOC constantly offers them technical support through publications and extension activities, such as meetings and talks, apart from providing them with personal assessment. This close relationship between the EEAOC and growers has benefited both parties and has promoted the sustainable development of the project.

From the institutional point of view, Vitroplantas is a transversal and highly interdisciplinary project since it involves technicians from different EEAOC departments: Sugarcane Agronomic Management and Breeding, Biotechnology, Phytopathology, Weed Control, Agricultural Zoology, Soil and Plant Nutrition, Remote Sensing and GIS, Agrometeorology and Economy and Statistics.

Thus, Biotechnology Department technicians are in charge of preparing mother plants and producing seedlings in vitro in the lab. In association with Phytopathology Department technicians, they are also responsible for phytosanitary controls by means of molecular diagnosis techniques to test mother plants and micropropagated seedlings for the most important diseases: ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), sugarcane leaf scald (*Xanthomonas albilineans*), Sugarcane mosaic and Sorghum mosaic virus. In this way, sanitary conditions of the vegetal material produced in vitro are ensured. This Department is also in charge of guaranteeing micropropagated material genetic identity by means of techniques that allow characterizing the molecular profile of each variety, so as to avoid the multiplication of lines with somaclonal variants.

The seedling acclimatization stage, prior to the planting of seedlings in the fields, is under the responsibility



of EEAOC Sugarcane Breeding specialists, who annually control about 50,000 in vitro produced seedlings in the greenhouses. It should be remarked that seedlings obtained in the lab are practically heterotrophic, present very low photosynthesis levels and take up all nutrients from an aqueous solution (culture medium) with minimum efforts. There is saturated humid air inside the culture flask, and the leaves practically do not present cuticles yet. In vitro seedling growth takes place under controlled light and temperature conditions. During acclimatization, seedlings have to become autotrophic, develop cuticles and take up nutrients from substrata that require major metabolic energy costs.

Once acclimatized, the seedlings are planted in the Basic Nursery, which constitutes the first stage of high quality seedcane multiplication in the field. This nursery is under the control and management of Sugarcane Agronomic Management and Breeding technicians. The careful management of this nursery includes crop rotation with legumes at the section where in vitro produced material will be planted. This enables the elimination of old stools, which can be sources of disease inoculum and affect the varietal purity of the nursery. Moreover, weeds are efficiently controlled (both mechanically and chemically), fertilizers (urea and foliar fertilizers), fungicides and insecticides are applied and irrigation is carried out. The average production of the Basic Nursery is 112,5 t seedcane/ha.

Material planted in the nursery remains under strict sanitary control. In December, Phytopathology Department specialists visit the nursery in order to check it out for disease symptoms. If stools infected with sugarcane smut or leaf scald disease are discovered, they are eliminated. In April, stalk samples are collected and taken to the lab in order to assess RSD and leaf scald incidence levels through serologic techniques (tissue-blot immunoenzymatic assay or TBIA).

The Basic Nursery supplies Registered Nurseries with seedcane at the second stage of

multiplication in the field of Vitroplantas Project. Registered Nurseries are planted in the fields of sugar factories, cooperatives and individual farmers, and Sugarcane Agronomic Management Department specialists are in charge of assessing growers and controlling sanitary conditions.

Certified Nurseries, which are planted with material from Registered Nurseries, constitute the last stage of production of high quality seedcane, which is finally used in commercial fields.

An important asset of Vitroplantas Project is its highly interdisciplinary nature, since from the institutional standpoint, it promotes integrated teamwork by different specialists to pursue a common goal. Besides, this feature reinforces the view that it is important, and profitable indeed, to assume an interdisciplinary approach to solve production problems.

Throughout these 10 years that the project has been implemented, a concrete and important problem in sugarcane production has been solved by supplying growers with high quality seedcane of the main commercial varieties planted in the province. In fact, this process accounts for the increase in sugarcane crop productivity recorded in Tucumán during the last decade.

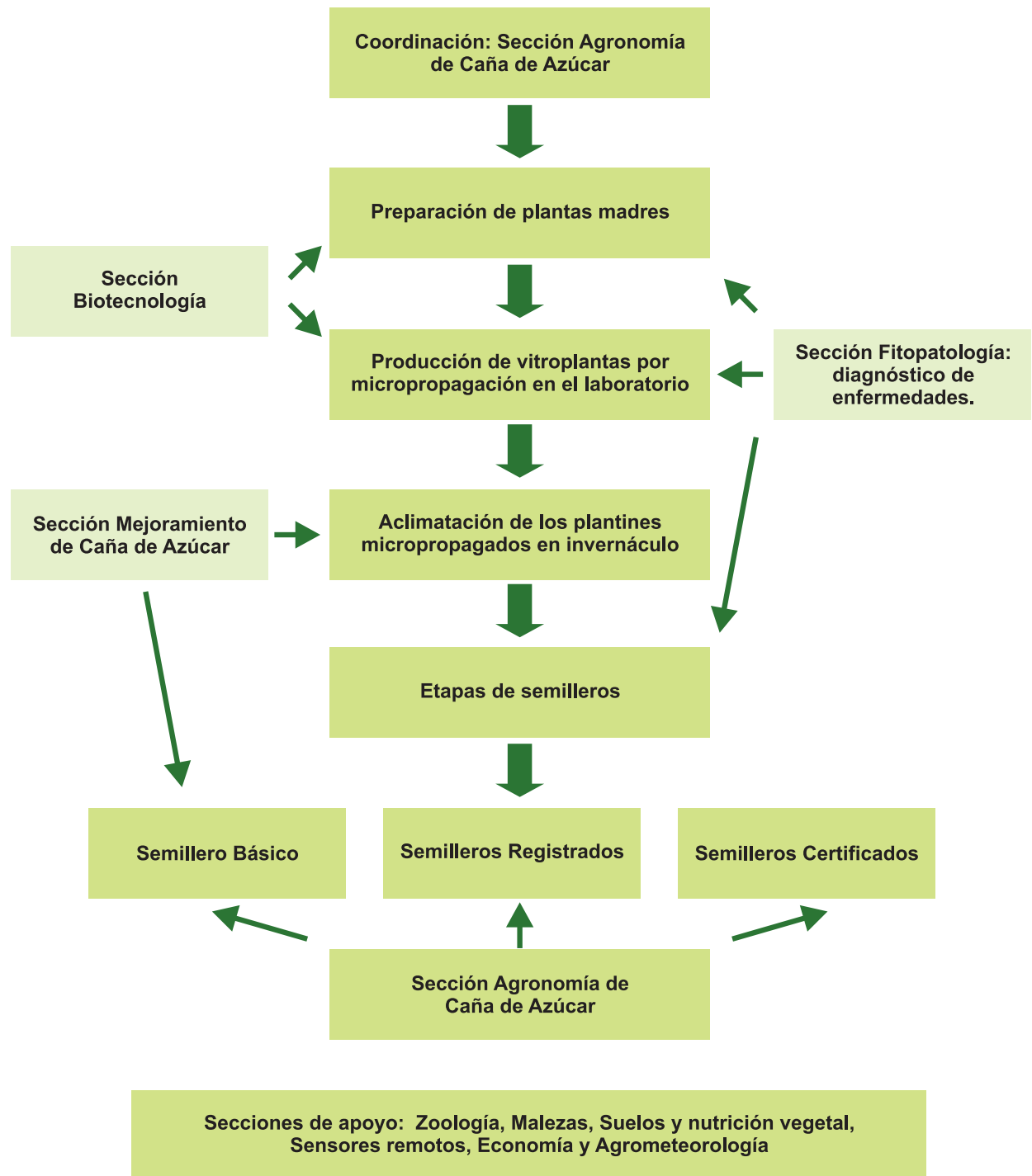
Another aim of this project is to promote the prompt use of new commercial varieties released by the Sugarcane Breeding Department, significantly reducing delays between the release of a variety and its widespread distribution among farmers.

At present, the implementation of the project results in a high quality seedcane production rate which is enough to cope with 45% of commercial crop renewal needs. This rate will be bound to rise when the project starts to be implemented on a broader basis and growers learn to use high quality seedcane more efficiently.

The use of high quality seedcane allows improving sugarcane crop sanitary conditions and yield in a significant way.

## PROYECTO VITROPLANTAS: PRODUCCION DE CAÑA SEMILLA DE ALTA CALIDAD

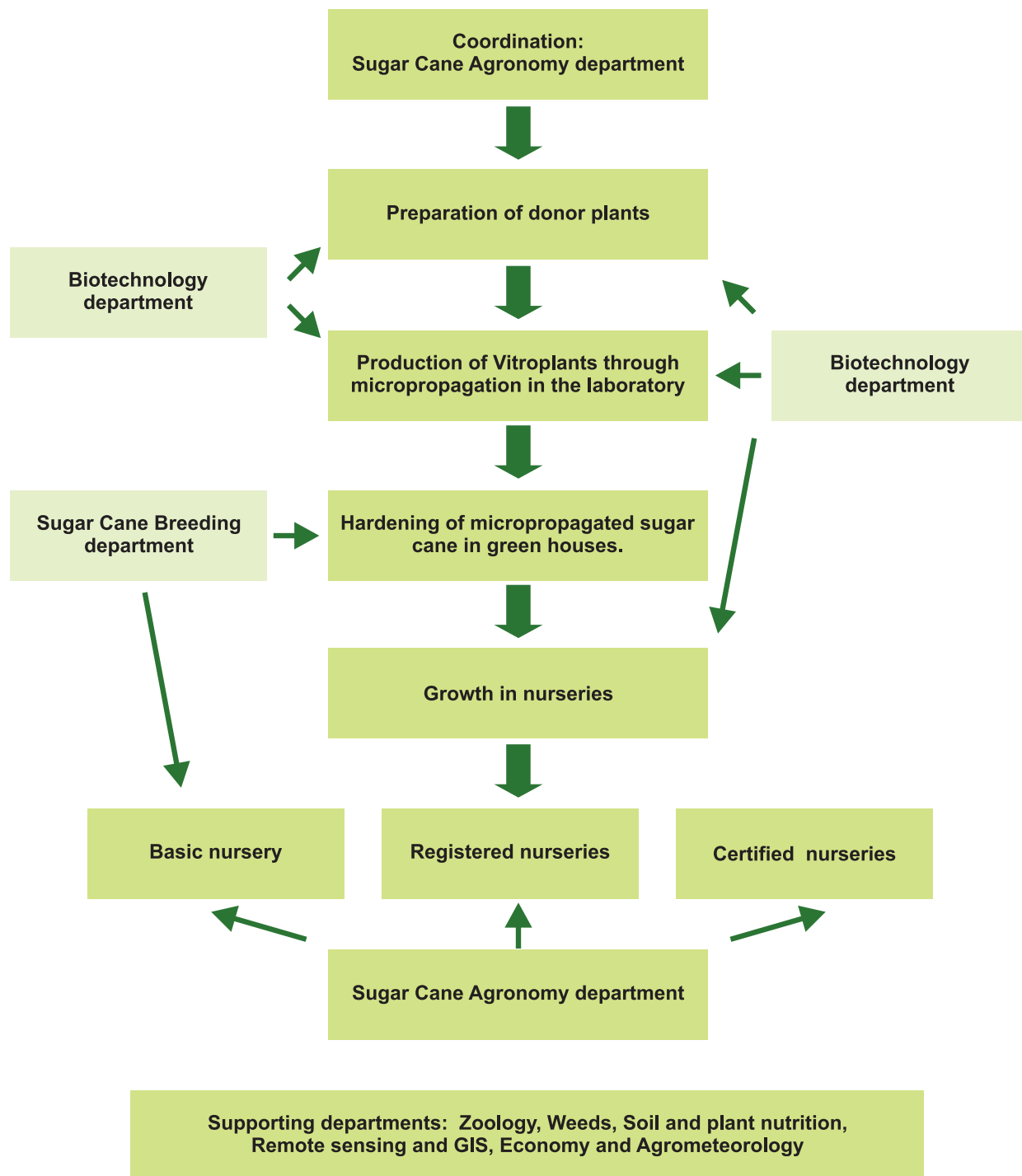
### ESQUEMA DEL PROYECTO VITROPLANTAS





## VITROPLANTAS PROJECT : PRODUCTION HIGH QUALITY SEED CANE

### DIAGRAM OF VITROPLANT PROJECT



## Sección: Agronomía de la caña de azúcar

Nombre y apellido	Profesión	Cargo	E-mail
Patricia A. Digonzelli	Ing. Agr. M.Sc.	Coordinadora Proyecto Vitroplantas	pdigonzelli@eeaoc.org.ar
Juan A. Giardina	Ing. Agr.	Técnico Profesional	jgiardina@eeaoc.org.ar
Rodrigo Ponce de León	Ing. Agr.	Becario de iniciación	rponcedeleon@eeaoc.org.ar
Agustín Sánchez Ducca	Ing. Agr.	Becario de iniciación	azanchezducca@eeaoc.org.ar

## Sección: Mejoramiento de la caña de azúcar

Nombre y apellido	Profesión	Cargo	E-mail
Carolina Díaz Romero	Ing. Agr.	Investigadora Asistente	cdiazromero@eeaoc.org.ar
María Inés Cuenya	Ing. Agr.	Investigadora Asociada	micuenya@eeaoc.org.ar
Ernesto Chavanne	Ing. Agr. M. Sc	Investigador Asociado	echavanne@eeaoc.org.ar
María Beatriz García	Ing. Agr.	Técnico profesional	mbgarcia@eeaoc.org.ar

## Sección: Fitopatología

Nombre y apellido	Profesión	Cargo	E-mail
Claudia Funes	Ing. Agr.	Técnica profesional	claudiafunes@eeaoc.org.ar
César Raúl Kairuz	Ing. Agr.	Bec. Graduado de iniciación	cesarkairuz@eeaoc.org.ar
Luis Ignacio Cazón	Estud. avanzado de Biotecnología	Becario Estudiantil	licazon@eeaoc.org.ar
María Belén Romero	Estud. avanzada de Biotecnología	Becaria Estudiantil	bromero@eeaoc.org.ar

## Sección: Biotecnología

Nombre y apellido	Profesión	Cargo	E-mail
Atilio Pedro Castagnaro	Dr. Agr.	Jefe de Sección	atilio@eeaoc.org.ar
Aldo Sergio Noguera	Ing. Agr.	Investigador	noguera@eeaoc.org.ar
María Paula Filippone	Dra. Cs. Biológ.	Investigador	paulafilippone@eeaoc.org.ar
Nora del valle Paz	Ing. Agr.	Técnico Profesional	npaz@eeaoc.org.ar
María Elena Díaz	Ing. Agr.	Técnico Profesional	elenadiaz@eeaoc
María Francisca Perera	Lic. Biotec.	Becaria de CONICET	franciscaperera@eeaoc.org.ar
Milena Sepúlveda Tusek	Lic. Biotec.	Ex Pasante	milenatusek@hotmail.com
Juan Alejandro Perea		Auxiliar Principiante	
Ivana Noemí Perez		Auxiliar Principiante	

## Secciones de apoyo: Zoología Agrícola, Sensores Remotos, Suelo, Economía y Estadística, Malezas y Agrometeorología

Nombre y apellido	Profesión	Cargo	E-mail
Gerardo Gastamiza	Ing. Agr. M. Sc.	Jefe Secc. Zoología Agrícola	ggastamiza@eeaoc.org.ar
Analía R. Salvatore	Ing. Agr. M. Sc.	Investigadora asistente	asalvatore@eeaoc.org.ar
Federico J. Soria	Lic. Geografía	Jefe Secc. Sensores Remotos	federicos@eeaoc.org.ar
Daniela R. Perez	Ing. Agr.	Jefe Secc. Economía y Estad.	danielaperez@eeaoc.org.ar
César M. Lamelas	Ing. Agr.	Jefe Secc. Agrometeorología	agrometeorología@eeaoc.org.ar
Ignacio L. Olea	Ing. Agr.	Jefe Sección Malezas	liolea@eeaoc.org.ar
Agustín G. Sanzano	Ing. Arg.M. Sc.	Jefe Sección Suelo	asanzano@eeaoc.org.ar



Se terminó de imprimir en octubre de 2010

