

## Proceso de producción de vitroplantas de caña de azúcar de pureza genética y sanidad garantizadas en etapa de laboratorio en la EEAOC

María Elena Díaz, M. Francisca Perera, Nora del Valle Paz, Paula Insaurralde Rocco, Natalia Silvia Ovejero, Ana M. Cerviño, Atilio P. Castagnaro y Aldo S. Noguera

### RESUMEN

El Proyecto Vitroplantas de caña de azúcar de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) se inició en 2001, con el objetivo principal de proporcionar a los productores caña semilla de alta calidad fitosanitaria y pureza genética garantizada. Desde el inicio se incorporaron mejoras en el proceso, como técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades y evaluación de la pureza genética. Hasta el 2004, la evaluación sanitaria de las vitroplantas para dos enfermedades sistémicas se llevaba a cabo mediante técnicas serológicas. A partir del 2005 se incorporó el diagnóstico molecular basado en PCR para las enfermedades sistémicas más importantes de la región. En 2014, el análisis de identidad genética de vitroplantas realizado desde 2007 por AFLP fue reemplazado por TRAP, que es menos costoso y revela un polimorfismo similar. Recientemente, se implementó un Sistema de Gestión de Calidad que permitió administrar y aumentar la eficiencia en cada paso del proceso de micropropagación. En el período 2001-2019 se micropropagaron 13 variedades comerciales y clones promisorios de caña de azúcar, alcanzando un total de 1.210.519 Vitroplantas. Actualmente, alrededor del 70% de la superficie plantada en Tucumán se cultiva con caña semilla de alta calidad producida por el Proyecto Vitroplantas, lo que se tradujo en una menor incidencia de enfermedades y un aumento gradual de los rendimientos en los campos comerciales de caña de azúcar. Desde el inicio, el Proyecto Vitroplantas ha buscado constantemente mejorar el proceso a fin de obtener un producto capaz de satisfacer la demanda de los productores de caña de azúcar.

**Palabras clave:** cultivo de tejidos, diagnóstico molecular, hidrotermoterapia, marcadores moleculares.

### ABSTRACT

#### Production process of sugarcane vitroplants of guaranteed genetic purity and health in the laboratory stage at the EEAOC

The Vitroplantas Project of sugarcane of Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) was started in 2001. Its main goal is to provide sugarcane producers with seed cane of high phytosanitary quality and guaranteed genetic purity. Since its beginning, improvements in the process such as molecular techniques for disease diagnosis and assessment of genetic purity, have been incorporated. Until 2004 the vitroplant sanitary evaluation for two systemic diseases was carried out by serological techniques. However, since 2005, molecular diagnoses based on PCR for the most regionally important systemic diseases of sugarcane were incorporated. In 2014, the genetic identity analysis of vitroplants undertaken since 2007 with AFLP was replaced by TRAP since it was cheaper and revealed similar polymorphisms. Recently, a Quality Management System, which allows effective administration and increases the efficiency at each step of the micropropagation process, was implemented. Over the 2001-2019 period, 13 commercial and promising sugarcane clones were micropropagated, reaching a total of 1,210,519 Vitroplants. Currently, around 70% of the area under cultivation in Tucumán is occupied by high quality sugarcane seeds produced by the Vitroplantas Project, resulting in lower disease incidence and a gradual increase in yields in commercial fields. This Project has constantly looked at improving the process to obtain a product able to satisfy sugarcane producers' demands.

**Key words:** hydrothermotherapy, molecular diagnosis, molecular markers, tissue culture.

*Fecha de recepción: 06/02/2020 - Fecha de aceptación: 19/08/2020*

## INTRODUCCIÓN

El Proyecto Vitroplantas (PV) se puso en marcha en la EEAOC en el año 2001 como una herramienta para disponer de “caña semilla” libre de patógenos, con el fin de disminuir la incidencia de algunas enfermedades ampliamente difundidas en la región que limitaban la capacidad productiva de los cañaverales.

Para la obtención de “caña semilla” libre de patógenos se recurrió al uso del cultivo *in vitro*. Dicha metodología ya estaba siendo empleada por varios países productores de azúcar - Cuba, Estados Unidos, Brasil y Colombia, entre otros - a escala comercial (Scandaliaris, 2010).

El uso del cultivo *in vitro* implica el crecimiento de una parte de una planta (células, tejidos u órganos) en un medio nutritivo artificial, en condiciones asépticas y en un ambiente controlado (temperatura, humedad, luz). Esta técnica se basa en el concepto de totipotencia celular (Haberlandt, 1902), que establece que una célula tiene la capacidad de regenerar un organismo completo. Esta herramienta biotecnológica tiene múltiples ventajas, entre ellas la propagación masiva de plantas (micropropagación) en cualquier época del año, en espacios reducidos y en un corto período de tiempo, además de la posibilidad de producir plantas libres de virus, a través del cultivo de meristemas (Hernández *et al.*, 1997). Los meristemas son un grupo de células indiferenciadas en división continua y sin tejido vascular, por lo que están relativamente aisladas del resto de la planta, lo cual permite obtener material libre de virus. Las pequeñas plantas que crecen en frascos de vidrio en condiciones asépticas y en un ambiente controlado son llamadas “vitroplantas”.

El objetivo del presente trabajo es resumir el desarrollo del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC desde que se inició en 2001 hasta 2019, destacando los principales avances logrados.

A través de este proyecto se micropropagan las

variedades difundidas y en difusión de nuestra región, como así también clones promisorios aportados por el Programa de Mejoramiento Genético de caña de azúcar (PMGCA) de la EEAOC.

La obtención de vitroplantas consta de cinco etapas (Noguera *et al.*, 2010) que se describen a continuación y se ilustran en la Figura 1:

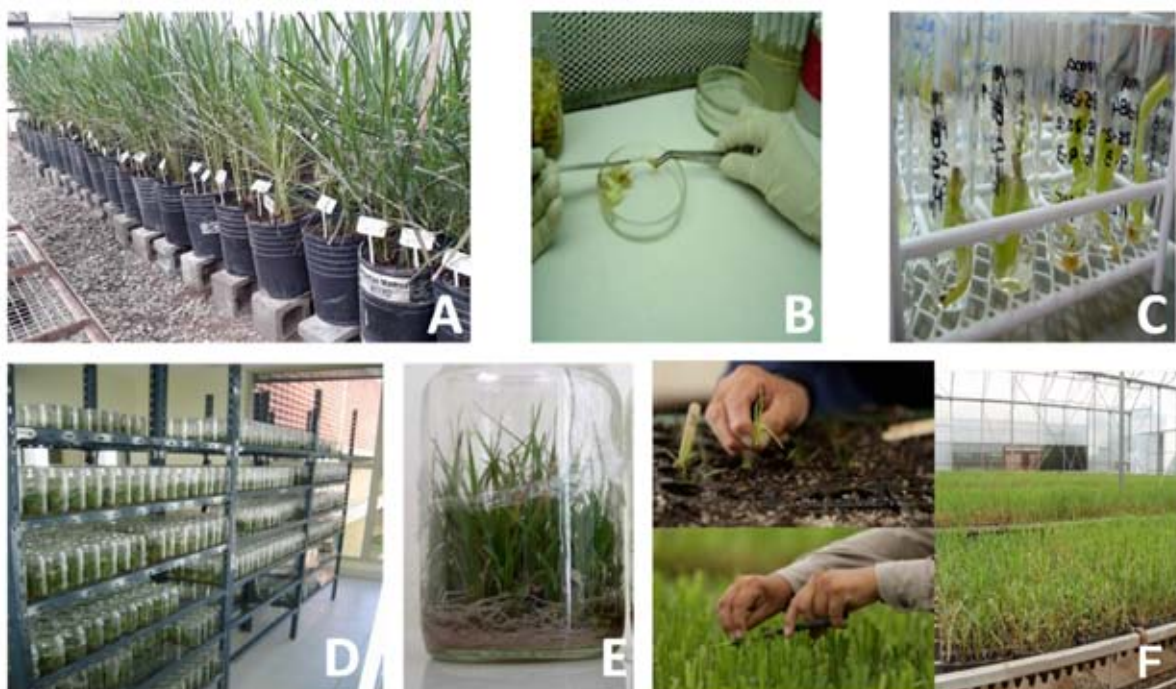
**Etapa 0.** Preparación del material vegetal de partida o donante: esta etapa se desarrolla en invernadero donde se cultivan y acondicionan las plantas “madre”, de las cuales se extraerán los meristemas.

**Etapa 1.** Establecimiento del cultivo *in vitro* o introducción: consiste en la implantación de los meristemas o ápices meristemáticos ya desinfectados en medio de cultivo adecuado para el desarrollo del brote. Cada meristema es identificado con un código que corresponde a una “línea”. Cada línea es un conjunto de plantines obtenidos *in vitro* que provienen de un mismo meristema apical de la planta madre, y esta individualización tiene como finalidad mantener la trazabilidad durante todo el proceso de producción de cada vitroplanta.

**Etapa 2.** Multiplicación: en esta fase se transfiere el material a otro medio de cultivo que promueve la activación de las yemas adventicias, para lograr la formación de los macollos que serán subdivididos en grupos de cuatro-cinco plántulas y transferidos periódicamente a medio de cultivo fresco, para la generación de mayor cantidad de plantas en cada subcultivo realizado.

**Etapa 3.** Enraizamiento: en medio de cultivo específico se estimula la generación de raíces para la posterior adaptación de las plantas a las condiciones *ex vitro*.

**Etapa 4.** Aclimatación: consiste en el traslado de las pequeñas plántulas a invernadero, a un ambiente con alta humedad relativa (HR) y baja intensidad lumínica durante las dos primeras semanas, para evitar la deshidratación; luego se reduce gradualmente la HR y se aumenta la intensidad de la luz para que resistan en forma eficiente el transplante a campo.



**Figura 1.** Etapas de producción de Vitroplantas hasta su transplante a campo. A) Banco de plantas madre. B) y C) Implantación de meristemas. D) Multiplicación. E) Enraizamiento. F) Aclimatación.

Como ya se mencionó previamente, el objetivo del PV es satisfacer las necesidades del sector productivo azucarero mediante la provisión de vitroplantas de caña de azúcar para la obtención de “caña semilla” libre de enfermedades, asegurando al mismo tiempo la pureza genética y buen vigor de esta. Por lo tanto, la alta calidad de la “caña semilla” que se produce en la EEAOC está relacionada principalmente con estos tres aspectos mencionados: identidad genética, sanidad y vigor.

La identidad genética implica que el material obtenido responde exactamente a las características de la variedad que se está multiplicando. Las técnicas de cultivo *in vitro* son métodos de propagación agámica y, por lo tanto, las plantas originadas de un mismo meristema o ápice meristemático son idénticas a la planta que le dio origen. A pesar de ello, durante el transcurso del proceso pueden ocurrir alteraciones genéticas (variación somaclonal) por el estrés al que son sometidos los tejidos (Larkin and Scowcroft, 1981; Phillips *et al.*, 1994).

En nuestro laboratorio se emplean diferentes estrategias de manejo para evitar la aparición de variación somaclonal, las que están relacionadas con la composición de los medios de cultivo usados, el número de subcultivos permitido (a mayor número de subcultivos, mayores posibilidades de alteraciones genéticas) y una permanente vigilancia de aparición de plantas fuera de tipo (arrosetadas, albinas, quimeras).

Además, la identidad genética es garantizada mediante análisis moleculares, en los cuales se comparan los perfiles genéticos de las vitroplantas al final del proceso (etapa de aclimatación) con el de la planta que les dio origen (planta madre). En nuestro laboratorio se optimizó una metodología de marcadores moleculares AFLP (siglas del inglés de “Amplified Fragment Length Polymorphism” o polimorfismos en la longitud de fragmentos de ADN amplificados) (Perera *et al.*, 2010).

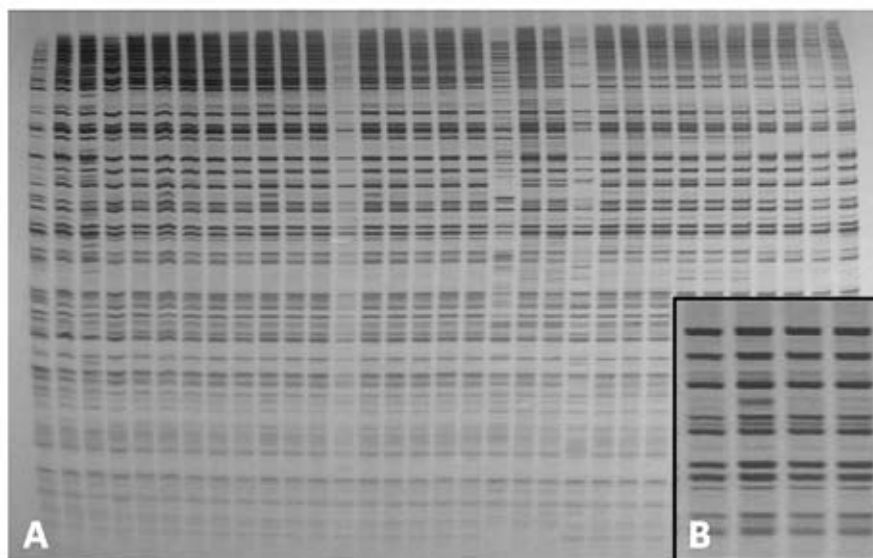
A partir del 2014, los AFLP fueron reemplazados por marcadores TRAP (siglas del inglés de “Target Region Amplification Polymorphism” o polimorfismos en la amplificación de regiones blanco) (Li and Quiros, 2001). Esta última técnica implica menos pasos y reactivos y por lo tanto resulta más económica que la empleada previamente. En la Figura 2 se muestra cómo se visualizan los perfiles genéticos.

Otra condición de la “caña semilla” de alta calidad es su sanidad, es decir, que esté libre o con mínima incidencia de patógenos y plagas. Esto se logra con una combinación de técnicas que incluyen la hidrotermoterapia del material de partida (Ramallo y Vázquez de Ramallo, 2001), la implantación de meristemas y los análisis moleculares para determinar la carga patogénica de los tejidos (Figura 3).

Con la hidrotermoterapia se logra eliminar o disminuir la presencia de bacterias, entre ellas *Leifosona xyli* subsp. *xyli* (RSD), en el material que conformará el plantel de plantas madre de donde se extraerán los meristemas. Esta consiste en sumergir en agua caliente a 52°C durante dos horas las estacas de caña de azúcar.

El empleo de meristemas como material de partida disminuye en gran medida la presencia de virus, debido a distribución irregular de estos en la planta, ya que la cantidad de los mismos disminuye progresivamente hacia el meristema. Además en estas zonas existe una elevada concentración de fito-hormonas y las células se encuentran en constante y rápida división; como no poseen tejido vascular, los virus y bacterias tienen pocas posibilidades de llegar a estos tejidos.

En relación a los análisis



**Figura 2.** A) Visualización de los perfiles genéticos de líneas de vitroplantas de caña de azúcar B) Ampliación de zona con un fragmento amplificado diferencial, donde cada columna corresponde a una línea micropropagada.



**Figura 3.** Metodologías que permiten asegurar la sanidad del material micropropagado. A) Equipo de hidrotermoterapia. B) Cultivo *in vitro* de meristemas. C) Diagnóstico molecular de enfermedades.

moleculares para el diagnóstico de enfermedades, se basan en la técnica de PCR (siglas del inglés de “Polymerase Chain Reaction”) la cual posibilita la detección de agentes patogénicos gracias a la amplificación de un fragmento de su ADN. Estos análisis se realizan al comienzo de la etapa 2, es decir antes de comenzar con la multiplicación masiva de las vitroplantas, para evitar el desperdicio de recursos en material no apto.

Por último, el vigor es otra característica que garantiza la elevada calidad de la caña semilla producida en la EEAO. El vigor está dado por la elevada capacidad de brotación y crecimiento de la caña semilla al finalizar el ciclo de cultivo *in vitro*. Esta característica es consecuencia, por un lado, del saneamiento logrado con el cultivo de meristemas; por el otro, del rejuvenecimiento que experimentan los tejidos cuando son cultivados *in vitro*.

La identidad genética, la sanidad y el vigor son, como ya se describió, las tres cualidades distintivas de las vitroplantas de caña de azúcar producidas en el Laboratorio de cultivos de tejidos de la Sección Biotecnología de la EEAO. Merece destacarse que en pos de lograr estas tres cualidades, el PV nunca fue estático y siempre estuvo interesado en incorporar cambios que mejoraran la eficiencia en alguna etapa del proceso de producción y acrecentaran la calidad del producto final obtenido. Todas estas mejoras se describen a continuación en orden de implementación (Figura 4).

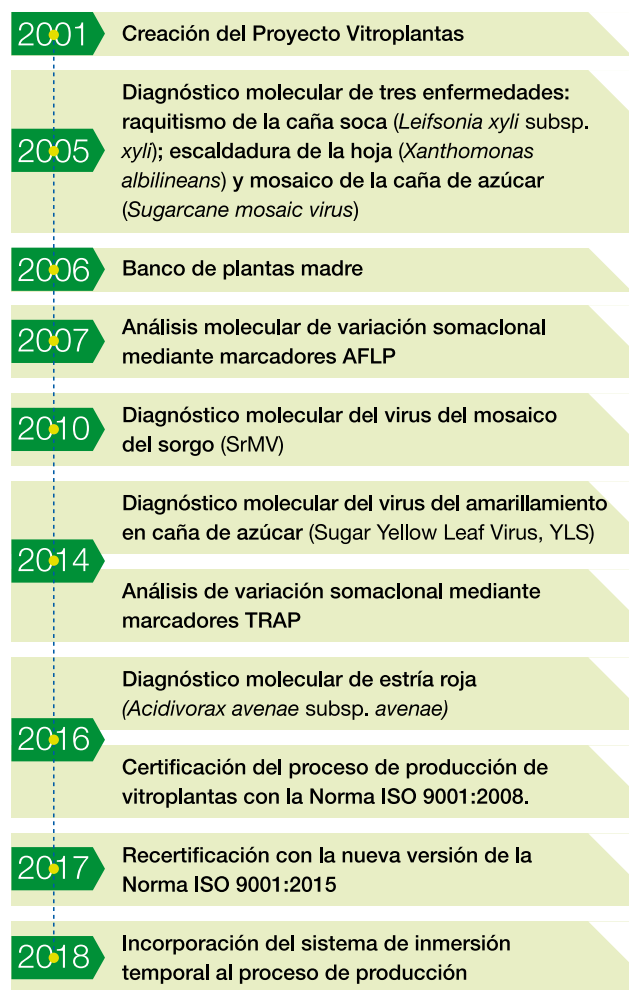


Figura 4. Mejoras implementadas en el Proyecto Vitroplantas desde su inicio.

En el año 2005 se incorporó el diagnóstico molecular de los agentes causales de tres de las enfermedades de mayor incidencia en los cañaverales de la provincia: raquitismo de la caña soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) (Pan *et al.*, 1998); escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) (Pan *et al.*, 1997; 1999) y mosaico de la caña de azúcar (SCMV, Sugarcane mosaic virus) (Perera *et al.*, 2009). Hasta 2005, la detección de los agentes causales de las enfermedades mencionadas se realizaba por serología. Sin embargo esta metodología fue reemplazada por técnicas moleculares, dado que poseen mayor sensibilidad, es decir que detectan la presencia del patógeno aun en concentraciones muy bajas.

En 2006 se conformó un Banco de Plantas Madre, lo que resultó fundamental para la organización de la producción de vitroplantas. La disponibilidad de un grupo de plantas en condiciones óptimas desde el punto de vista genético, fisiológico y sanitario permite disponer de material vegetal vigoroso y uniforme para organizar las fechas de implantación de meristemas y lograr una mayor eficiencia en todo el proceso. A este plantel de plantas madre, que se renueva cada tres años, también se le realiza el diagnóstico molecular de enfermedades.

En 2007 se incorporó el análisis de la variación somaclonal para estimar los cambios genéticos que pueden producirse durante el proceso. Dicho análisis se realiza mediante el uso de marcadores moleculares AFLP. Con este estudio se verifica y asegura la identidad genética del material en la etapa de aclimatación, luego de concluir la etapa de laboratorio y antes de ser trasladado a campo.

En el año 2010 se añadió la detección del virus del mosaico del sorgo (*Sorghum mosaic virus*, SrMV) al diagnóstico de enfermedades. El mosaico de la caña de azúcar es una de las enfermedades virales más importantes del cultivo. Los virus comúnmente asociados con los síntomas de mosaico corresponden a numerosas razas del SCMV (cuya presencia se diagnosticaba desde 2005) y del SrMV (Perera *et al.*, 2009), razón por la cual se incorporó la detección de este agente causal al diagnóstico molecular de enfermedades de las vitroplantas.

En 2014 se sumó al diagnóstico de enfermedades el análisis del virus del amarillamiento de la caña de azúcar (*Sugarcane yellow leaf virus*, YLS). Esta enfermedad se encuentra mucho más difundida en Tucumán de lo que se esperaba según las evaluaciones visuales de los síntomas (Bertani *et al.*, 2014). Por ese motivo se incluyeron diferentes estrategias para controlar la enfermedad, entre ellas la incorporación del diagnóstico en el esquema del PV.

Ya se mencionó que en 2014 se cambió el tipo de marcadores moleculares para el estudio de la variación somaclonal de las vitroplantas en etapa de rusticación.

En 2016 se agregó a las enfermedades evaluadas por diagnóstico molecular la estría roja (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*), debido al incremento en su incidencia, particularmente en el norte del país (Fontana *et al.*, 2013). Con esta última incorporación en el esquema del Proyecto Vitroplantas se asegura la sanidad respecto a cinco enfermedades de importancia en la región.

En 2016 también se logró la certificación del proceso de producción de vitroplantas con la Norma ISO 9001:2008, y en 2017 se re-certificó el proceso incorporando todas las adaptaciones a la última versión de la norma (2015). Este logro implicó no solo la búsqueda de la calidad óptima de las vitroplantas producidas, sino que se



incorporó el concepto de Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) en la etapa de laboratorio del proceso de PV. El SGC es una herramienta adicional que el PV utiliza para alcanzar los objetivos planteados.

En 2018 se incorporó la técnica de Inmersión temporal al proceso de producción que se realizaba hasta el momento únicamente en medios estáticos. Los sistemas de inmersión temporal son sistemas semi-automatizados en los que el funcionamiento se basa en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con el material vegetal por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos. Las plantas producidas con este procedimiento son de mayor tamaño y están pre-rusticadas al salir del laboratorio por las características propias de este tipo de método (Figura 5). Esta tecnología incorporada, además de mejorar la calidad de las plantas producidas, implica menos mano de obra y mayor eficiencia en el consumo de medios de cultivo.

En la Tabla 1 se resumen las vitroplantas producidas en el marco del Proyecto de las diferentes variedades y clones promisorios, desde su inicio en 2001 hasta el año 2019.

### CONCLUSIONES

EL PV ha provisto de caña semilla de alta calidad de las principales variedades cultivadas en la provincia a los productores locales. Hasta 2017, alrededor del 70% de la superficie de los Semilleros Registrados (segunda etapa de multiplicación a campo de la caña semilla de alta calidad) estuvo implantada con la caña semilla saneada generada por el PV de las nuevas variedades producidas por el Programa de Mejoramiento Genético de Caña de Azúcar de la EEAOC (Giardina, 2018).

Con el uso de esta caña semilla la incidencia de



Figura 5. Plantas obtenidas con el sistema de inmersión temporal.

enfermedades ha disminuido considerablemente. Asimismo, debido a la sanidad y al vigor del material micropropagado por el PV, la producción promedio de la caña semilla de alta calidad varía entre 78 a 95 t/ha, valores que demuestran la elevada capacidad productiva de esta, teniendo en cuenta que el rendimiento cultural promedio de los lotes comerciales de la provincia oscila entre 60 y 65 t/ha (Giardina, 2018).

Otra ventaja que debe mencionarse es la posibilidad que se les brinda a los productores para un rápido acceso a las nuevas variedades producidas por el programa de mejoramiento de la EEAOC, permitiéndoles renovar su cañaveral con material genético de alta sanidad y mejor productividad.

En síntesis, el PV ha buscado permanentemente desde sus inicios mejorar los procesos para lograr un pro-

Tabla 1. Plantines producidos por el Proyecto Vitroplantas de la EEAOC en el período 2001-2019.

Año	Genotipos														Total
	CP 65-357	L 75-33	LCP 85-376	LCP 85-384	RA 87-2	RA 87-3	TUC 00-19	TUC 03-12	TUC 89-28	TUC 95-10	TUC 95-37	TUC 97-8	TUCCP 77-42	Clones promisorios	
2001	21.547		3.096	47.345	1.546	3.409							1.611		78.554
2002			3.735		4.958	5.808							3.091		17.592
2003	4.190	3.223	3.201	3.118	1.522	9.293							3.347		27.894
2004				12.275		5.304			82		317		1.071	7143	26.192
2005	2.443	3.612		10.423		28.344							7.199	2168	54.189
2006	13.324			15.401		16.682							4.960	5078	55.445
2007				12.853		9.103			10.030		6.360	6.239	8.757	17729	71.071
2008				16.326		3.533			1.424		6.255	11.360	9.890	6.389	55.177
2009				16.587		9.016						12.718	16.666	9.579	74.286
2010				15.112						24.635	13.248	13.047	5.550		71.592
2011				18.600						36.706	18.087	11.671	4067		89.131
2012				17.319				6.963		32.384	7.870	26.229	6.753		97.518
2013				25.472				2.670		29.015	11.095	29.871	7.187		105.310
2014				9.572				15.984	1.342	3.753	7.283	30.294	12.293	5.668	86.189
2015				12.400				11.081	12.123	17.711	7.554	28.597	2.128	666	92.260
2016				8.311				2.407	7.199	28.843	7.893	6.907	5.838		67.398
2017				56				295	746	467		20768			22.332
2018				8.367				6047	966	20701		27675			63.756
2019				5.685				4449	19070	5283		5276		14.870	54.633
<b>Total</b>	<b>41.504</b>	<b>6.835</b>	<b>10.032</b>	<b>255.222</b>	<b>8.026</b>	<b>90.492</b>	<b>49.896</b>	<b>41.446</b>	<b>11.536</b>	<b>199.498</b>	<b>98.680</b>	<b>234.600</b>	<b>93.321</b>	<b>69.431</b>	<b>1.210.519</b>

ducto final que cumpla e incremente la satisfacción de los productores azucareros y, de esta manera, lograr un desarrollo sostenible que ya cuenta con 19 años de historia.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- Bertani, R. P.; M. F. Perera; M. E. Arias; C. Luque; C. Funes; V. González; M. I. Cuenya; L. D. Ploper and A. P. Castagnaro. 2014. A study of Sugarcane yellow leaf disease in Argentina. *Plant Disease*.doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1251-RE. 98(8): 1036 - 1042.
- Fontana, P. D.; A. M. Rago; C. A. Fontana; G. M. Vignolo; P.S. Cocconcelli and J. A. Mariotti. 2013. Isolation and genetic characterization of *Acidovorax avenae* from red stripe infected sugarcane in Northwestern Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 137: 525 - 534.
- Giardina, J. A. 2018. Evolución del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC. Producción de caña semilla de alta calidad en Tucumán, período 2013-2017. *Avance Agroindustrial* 39 (2): 22 - 27.
- Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Stz-Ver, Mat-Nat. Kl. Klais, Akad Wiss* 111 (1): 69 - 92.
- Hernández, R.; Y. Igarza; Y. González; E. Peralta; J. Fontanella; T. Pichardo; J. C. Noa; L. García; E. Alfonso y M. Rodríguez. 1997. Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). *Cuadernos de Fitopatología* 54: 153 - 157.
- Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plantimprovement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197 - 214.
- Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103(2-3): 455 -461.
- Noguera, A. S.; N. V. Paz; M. E. Díaz; M. F. Perera; M. Sepúlveda Tusek; M. P. Filippone y A. P. Castagnaro. 2010. La producción de caña semilla de alta calidad comienza en el laboratorio. Publicación Especial EEAOC. Proyecto Vitroplantas: producción de caña semilla de alta calidad. 40: 13 - 20.
- Pan, Y. B.; M. P. Grisham and D. M. 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.
- Pan, Y. B.; M. P. Grisham; D. M. Burner; B. L. Legendre and Q. Wei. 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.
- Perera, M. F.; M. P. Filippone; 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.
- Perera, M. F.; M. G. García; A. S. Noguera; M. Sepúlveda Tusek; M. P. Filippone y A. P. Castagnaro. 2010. Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante Marcadores Moleculares. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 87 (2): 13 - 21. ([www.scielo.org.ar/scielo.php](http://www.scielo.org.ar/scielo.php). a mitad del 2011).
- Phillips, R. L.; S. M. Kaeppeler and P. Olhoft. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 5222 - 5226.
- Ramallo, J. y N. Vázquez de Ramallo. 2001. Aplicación de hidrotermoterapia para la obtención de caña semilla de sanidad controlada. *Revista Avance Agroindustrial* 22 (2): 16 - 18.
- Scandaliaris, J. 2010. El Proyecto Vitroplantas: su concepción, sus inicios y su impacto en la Agroindustria de la caña de Azúcar, Publicación especial Vitroplantas: 3 - 5.