



Revista Industrial
y Agrícola de
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea
1851-3018

Tomo 99 (2):
13-18; 2022



ESTACION EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150
T4101XAC - Las Talitas.
Tucumán, Argentina.

Trabajo subsidiado
por la Estación
Experimental
Agroindustrial
Obispo Colombres
(EEAOC), Consejo
Nacional de
Investigaciones
Científicas
y Técnicas
(CONICET) y
proyecto PICTO
2016-0120 de la
Agencia Nacional
de Promoción
Científica y
Tecnológica
(ANPCyT).

Fecha de
recepción:
15/06/2021

Fecha de
aceptación:
15/09/2021

Estudio de parámetros involucrados en la transformación genética de la caña de azúcar (*Saccharum spp*) mediante embriogénesis directa

Florencia Budeguer*, Ramón Enrique*, Bjorn Welin*, Aldo Noguera* y Josefina Racedo*

* Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Las Talitas, Tucumán, R. Argentina, T4101XAC. Email: florbudeguer88@gmail.com

RESUMEN

El tiempo promedio requerido para regenerar una planta transgénica completa a partir de callos embriogénicos (Embriogénesis Somática Indirecta, ESI) es de seis a nueve meses. La embriogénesis somática directa (ESD) es una vía morfogénica alternativa que permite obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación del callo, lo cual conlleva diversas ventajas tales como la disminución en el tiempo de regeneración, el menor número de subcultivos y una menor probabilidad de aparición de variantes somaclonales. Además, otros parámetros del proceso de transformación como tipo de microproyectiles, edad de los embriones somáticos y cantidad de ADN pueden afectar la eficiencia del mismo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la eficiencia de transformación genética de la variedad comercial local de caña de azúcar TUC 95-10 a partir de explantos obtenidos por ESD. Se ensayaron, asimismo, las variables tipo de micropartículas, edad de los embriones somáticos y cantidad de ADN mediante el uso del gen reportero *gfp* (del inglés "green fluorescent protein"), bajo la regulación del promotor constitutivo CaMV35S. El mayor número de puntos de expresión estables (puntos GFP) se observó cuando los bombardeos se efectuaron con partículas de oro. En la evaluación de las diferentes edades de los embriones somáticos (10 y 18 días) y concentraciones de ADN (2,5 y 5 µg) no se observaron diferencias significativas en el número de puntos GFP. Los resultados sugieren que la utilización de partículas de oro con una concentración de ADN de 2,5 µg y explantos de discos de hojas de 10 días mejora la eficiencia del protocolo de transformación genética en caña de azúcar, reduciendo el tiempo y la cantidad de ADN requeridos.

Palabras clave: caña de azúcar, proteína verde fluorescente, embriones somáticos directos, micropartículas de oro, eficiencia de transformación.

ABSTRACT

Study of the parameters involved in the genetic transformation of sugarcane (*Saccharum spp*) by direct embryogenesis

The average time required to regenerate a complete transgenic plant from embryogenic calli (Indirect Somatic Embryogenesis, ESI) is 6 to 9 months. Direct somatic embryogenesis (ESD) is an alternative morphogenic pathway that allows obtaining somatic embryos directly from isolated cells or groups of cells without the formation of callus, which has several advantages such as the reduction in regeneration time, the lower number of subcultures and a lower probability of somaclonal variation. In addition, other parameters of the transformation process such as the type of microprojectiles, the age of the somatic embryos and the amount of DNA can affect its efficiency. The objective of the present work was to study the genetic transformation efficiency of the local commercial sugarcane variety TUC 95-10 from explants obtained by ESD. Likewise, the variables type of microparticles, age of the somatic embryos and amount of DNA were analyzed by using the reporter gene *gfp* ("green fluorescent protein"), under the regulation of the constitutive promoter CaMV35S.

The highest number of stable expression points (GFP points) was observed when bombardments were carried out with gold particles. In the evaluation of the different ages of the somatic embryos (10 and 18 days) and DNA concentrations (2.5 and 5 µg), no significant differences were observed in the number of GFP points. The observed results suggest that the use of gold particles with a DNA concentration of 2.5 µg and explants of 10-day-old leaf discs improves the efficiency of the genetic transformation protocol in sugarcane.

Key words: sugarcane, green fluorescent protein, direct somatic embryos, gold microparticles, tungsten microparticles, transformation efficiency.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum spp*) posee un rol fundamental en la economía global, no solo como una fuente tradicional de alimento que abastece el 80% del consumo mundial de azúcar, sino también como fuente de biomasa para la producción de energía, biocombustibles y subproductos como el papel, el ácido acético y las enzimas industriales (Hatch, 2005; OECD/FAO, 2018; Cursi *et al.*, 2021). Estas características inducen una demanda creciente del cultivo, por lo cual es fundamental generar nuevas variedades de alto rendimiento de biomasa, además de un elevado contenido de azúcar.

El principal objetivo de la mayoría de los programas de mejoramiento genético de la caña de azúcar alrededor del mundo es el desarrollo de nuevas variedades comerciales competitivas y adaptadas a las condiciones y prácticas del cultivo en cada región. Debido a la complejidad genómica de la caña de azúcar (Thirugnanasambandam *et al.*, 2018) y la magnitud de los ensayos requeridos para las evaluaciones, el proceso para la obtención de nuevas variedades es lento y laborioso, ya que requiere entre 10 y 15 años de trabajo exhaustivo de selección (Ostengo *et al.*, 2021). Los progresos obtenidos mediante la mejora genética clásica son indiscutibles; sin embargo, el mejoramiento tradicional se encuentra limitado a los genes y las características disponibles en el acervo genético de las especies relacionadas que dieron origen a los híbridos modernos. Es por ello que la biotecnología, a través de la ingeniería genética, se convierte en una herramienta muy útil para los mejoradores, ya que ofrece la posibilidad de incorporar características de interés desde cualquier organismo a las variedades ya mejoradas, mediante la transformación genética (Nerkar *et al.*, 2018).

Desde inicios de la década de los '90 se realizan intensos esfuerzos para el desarrollo de protocolos eficientes de transformación genética de la caña que incluye técnicas que involucran la electroporación de protoplastos (Chen *et al.*, 1987) y el bombardeo de micropartículas (biobalística) sobre suspensiones celulares, callos embrionarios o tejido meristemático (Bowerand Birch, 1992; Sun *et al.*, 1993; Gambley *et al.*, 1994; Gallo-Meagher and Irvine, 1996). También se han descrito métodos directos de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con adecuada eficiencia para transformar variedades comerciales (Arencibia *et al.*, 1998; Enriquez-Obregon *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 1998). Entre las metodologías disponibles, el bombardeo de micropartículas (biobalística) sobre callos embrionarios es la más utilizada; sin embargo, el uso de este tipo de explanto presenta algunas limitaciones, entre ellas la enorme labor para el establecimiento, desarrollo y mantenimiento del cultivo de callos y el mayor tiempo para la obtención de plantas transgénicas completas por esta vía indirecta (hasta 36 semanas) (Bower *et al.*, 1996; Snyman *et al.*, 2000). La posibilidad de emplear una vía de morfogénesis directa a partir de discos de hojas inmaduras permite obtener plantas transgénicas completas de modo más rápido (Snyman *et al.*, 2000; Snyman *et al.*, 2006; Taparia *et al.*, 2012). Estudios previos concluyeron que este procedimiento ofrece un gran potencial para el desarrollo de la transformación genética de cultivares de

interés comercial, ya que no solo disminuye los costos y el tiempo del proceso, sino que también disminuye las posibilidades de variación somaclonal debida al cultivo de callos.

El éxito del mejoramiento de los cultivos mediante transformación genética es factible cuando existen vectores de transformación adecuados y métodos eficientes de transferencia de genes con regeneración completa de las plantas (Anunanthini *et al.*, 2017). Sin embargo, existen aún muchos desafíos tales como el genotipo, el tipo de explanto, los genes de selección y el tiempo de regeneración. Estos parámetros, por lo tanto, deben ser estandarizados para lograr el desarrollo de una caña de azúcar transgénica con las características deseadas (Anunanthini *et al.*, 2017). La expresión estable o transitoria temprana de genes reporteros es muy útil en el monitoreo de la eficiencia de transformación y en el ajuste de los parámetros de bombardeo, y es además utilizada para estudios de regulación y función génica, especificidad de promotores, etc. Los genes reporteros son aquellos que pueden ser detectados (cualitativa o cuantitativamente) en células o plantas transgénicas por sus productos de expresión (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). La proteína GFP es la proteína fluorescente más estudiada como reportera (Shaner *et al.*, 2005; Millwood *et al.*, 2008; Kremers *et al.*, 2011). Una ventaja muy importante es que los puntos GFP se pueden visualizar bajo lupa fluorescente sin necesidad de eliminar la clorofila del tejido; por consiguiente, es un método muy directo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la eficiencia del procedimiento de transformación genética por biobalística de embriones somáticos directos de caña de azúcar, mediante la evaluación de parámetros tales como tipo de micropartículas, edad de los embriones somáticos y cantidad de ADN, mediante la transformación genética con el gen reportero *gfp*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo de embriones somáticos directos (ESD)

Se colectaron ápices caulinares de plantas de caña de azúcar de alrededor de 1 m de altura correspondientes a la variedad TUC 95-10 cosechadas de lotes de la EEAOC localizados en Las Talitas, Tucumán, Argentina. Las hojas externas se desinfectaron con etanol al 70% antes de ser removidas en condiciones de asepsia. Posteriormente, secciones transversales de 2 mm del cilindro de hojas inmaduras fueron cortadas en cabina de flujo laminar y colocadas en medio de cultivo de iniciación. Para el desarrollo de embriones somáticos directos se utilizó el medio MS (*Phyto Technology Laboratories*) (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con ácido p-clorofenoxiacético (2,3 mg/l), ácido 1-naftalenacético (1,86 mg/l) y 6-bencilaminopurina (0,9 mg/l). Los explantos fueron incubados a una intensidad de luz de 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 16h:8h (luz:oscuridad) a 28°C. Transcurridos siete días desde la iniciación del cultivo, los discos con mayor respuesta se repicaron a medio fresco hasta el momento de realización de los disparos para la transferencia de genes.

Construcción del vector de transformación con el gen reportero *gfp*

El vector de transformación pFB1 fue construido a partir del plásmido pBin GFP 19s (Ghorbel *et al.*, 1999), que contiene el gen *gfp* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV35S) y el terminador de la nopalinasintasa (*Tnos*). El cassette de expresión antes mencionado fue removido mediante digestión con las enzimas *Hind* III y *Eco*RI y clonado en el plásmido pBluescript II KS (+) digerido con las mismas enzimas. El ensamblado correcto del plásmido pFB1 fue verificado mediante digestión con las enzimas de restricción antes mencionadas.

Transformación genética por biobalística con el vector pFB1

Los explantos (discos de hojas) se colocaron en medio osmótico (medio de iniciación suplementado con sorbitol 0,4 M) durante cuatro horas antes de la transformación genética. Los disparos se realizaron con el equipo PDS-1000 / He (Embrapa), con discos de ruptura de 1100 psi y a una distancia de 6 cm entre la membrana carreadora y los explantos. Transcurridas 16 h desde el bombardeo, los explantos se transfirieron a medio de iniciación, donde permanecieron durante 10 días para su recuperación. Al cabo de este tiempo, se cuantificaron los puntos de expresión de GFP utilizando un estereomicroscopio de disección (Leica MZ6). Se incluyeron como control discos de hojas bombardeados con micropartículas sin ADN.

Preparación de partículas para el bombardeo

Se evaluaron dos tipos de micropartículas, oro y tungsteno, como transporte del material genético hacia el interior de las células. Los procedimientos de lavado de las micropartículas y precipitación del ADN sobre estas varían según el tipo. Para los bombardeos con micropartículas de oro se siguió el protocolo descrito previamente por Altpeterand Sandhu (2010). En este caso, para 18 disparos se utilizaron 1,8 mg de microproyectiles de oro (1 μ m de diámetro, BioRad) recubiertos con 3,6 μ g del pFB1. En el caso de las micropartículas de tungsteno (M10, diámetro promedio de 0,8 μ m) se utilizaron 3,6 μ g de pFB1 para seis disparos, siguiendo el protocolo de Noguera *et al.* (2015).

Edad de los explantos

Con el objetivo de evaluar la incidencia de la edad de los explantos en el número de eventos de transformación obtenidos, se realizaron experimentos con explantos de 10 y 18 días desde el inicio del cultivo *in vitro*. Los bombardeos se realizaron con micropartículas de oro (1,8 mg) (Altpeterand Sandhu, 2010) sobre las cuales se precipitó el plásmido pFB1 (5 μ g de ADN). Al cabo de 10 días se cuantificaron los puntos verdes de expresión GFP.

Cantidad de ADN

Con el objetivo de evaluar el efecto de la cantidad de ADN en el número de eventos de transformación obtenidos, se realizaron experimentos con 2,5 y 5 μ g del

plásmido pFB1 (GFP) precipitado sobre micropartículas de oro. Se utilizaron como explantos discos de hojas inducidos a la embriogénesis durante 10 días y el plásmido pFB1 fue precipitado a razón de 2,5 y 5 μ g de ADN sobre las micropartículas de oro. El procedimiento de transformación y la visualización de los puntos GFP se llevó a cabo según lo descrito anteriormente para embriones somáticos directos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la cuantificación de la expresión del gen *gfp* en los diferentes experimentos realizados (tipo de micropartículas, edad de los embriones y cantidad de ADN) se analizaron mediante un modelo lineal generalizado, bajo una distribución Poisson para un diseño a un criterio de clasificación (dos niveles) y se realizó la prueba a posteriori de Fisher (LSD) ($P < 0,05$) utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Además, para el ensayo de tipo de micropartículas se presenta una gráfica de densidad de puntos con el mismo software.

RESULTADOS

Influencia del tipo de partículas

Para el experimento de evaluación de los diferentes tipos de partículas se sembraron un total de 72 discos de hojas y al cabo de siete días se transfirieron a medio fresco aquellos que presentaron un aspecto granulado (formación de embriones) en la superficie del explanto. Se utilizaron 32 discos para el bombardeo con cada tipo de partículas (oro y tungsteno). En la Tabla 1 se muestran los resultados de la integración estable del gen *gfp* registrada a los 10 días de los bombardeos. Se determinó que existen diferencias significativas entre los dos tipos de partículas utilizados, demostrando que el proceso de transformación genética con partículas de oro fue 10 veces más eficiente que el protocolo con micropartículas de tungsteno (Tabla 1 y Figura 1). Además, en la Figura 2 se observa en el tratamiento con micropartículas de oro una distribución de puntos GFP homogénea entre los valores de 0 y 13; en cambio, con las micropartículas de tungsteno, la frecuencia de puntos GFP se distribuye entre 0 y 6, siendo mayor en 0.

Tabla 1. Comparación de los distintos factores estudiados en experimentos independientes de transformación con el gen reportero *gfp*.

Tipo de micropartículas	Edad de los discos	Cantidad de ADN	n ^a	media ^b	MIN	MAX
Oro	10 días	3,6 μ g	32	6,63 A	0	43
Tungsteno	10 días	3,6 μ g	32	0,63 B	0	6
Oro	10 días	3,6 μ g	66	5,80 A	0	43
Oro	18 días	3,6 μ g	62	8,02 A	0	53
Oro	10 días	2,5 μg	30	8,93 A	2	22
Oro	10 días	5,0 μg	30	8,37 A	1	32

^a Discos de hojas bombardeados

^b Valor de la media de los puntos GFP en cada condición; medias con una letra común no son significativamente diferentes en cada ensayo ($p > 0,05$).

A

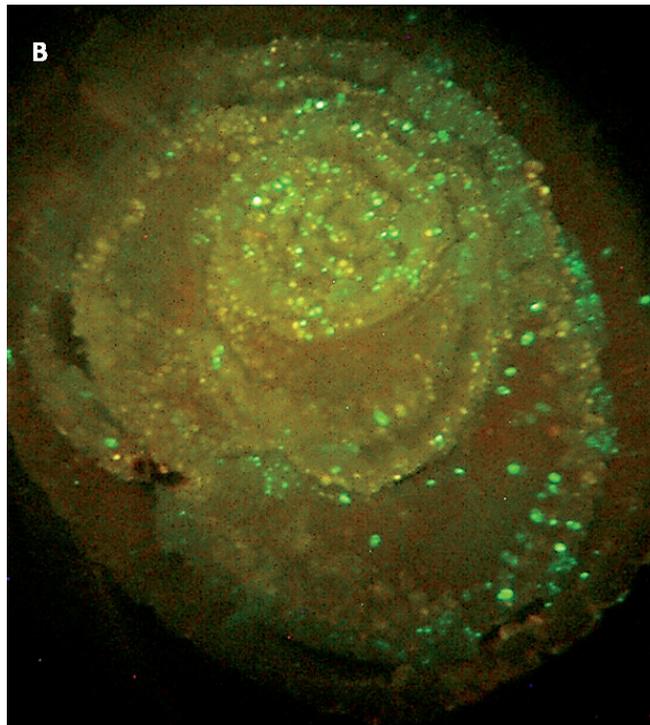


Figura 1. A. Esquema del plásmido pFB1 construido para la transformación genética de discos de hojas con el gen reportero *gfp*. **B.** Discos de hojas bombardeados con micropartículas de oro, recubiertas con pFB1. **C.** Discos de hojas bombardeados con micropartículas de tungsteno, recubiertas con pFB1.

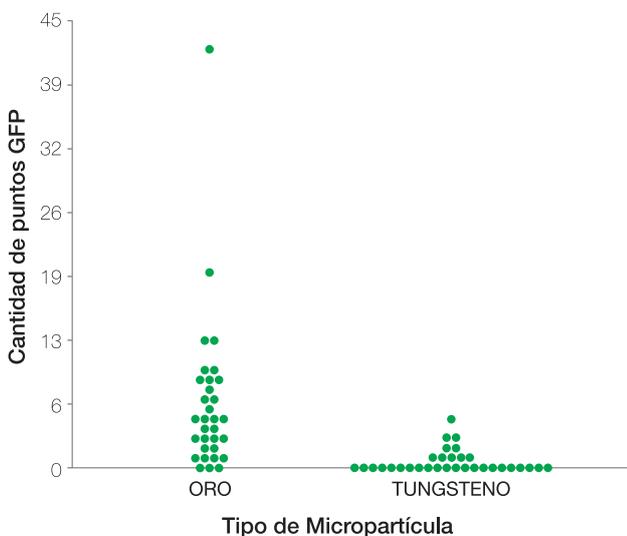


Figura 2. Dispersión del número de puntos GFP contabilizados en cada disco de material vegetal bombardeado con microproyectiles de oro vs. tungsteno.

Influencia de la edad de los embriones somáticos

A partir de 71 ápices se sembraron 144 discos de hojas óptimos para la transformación. Se utilizaron 66 y 62 discos de 10 y 18 días de edad para el bombardeo con partículas de oro, respectivamente. Los resultados de la integración estable del gen *gfp* registrada a los 10 días del bombardeo se muestran en la Tabla 1. Los resultados nos permiten indicar que no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos evaluados.

Cantidad de ADN

Con el propósito de determinar el efecto de la cantidad de ADN sobre la eficiencia de transformación, se bombardearon 30 discos de hojas con 2,5 µg de pFB1 y otros 30 discos con 5 µg del plásmido. Los resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de puntos GFP observados en los dos tratamientos evaluados (Tabla 1).

DISCUSIÓN

El desarrollo de un protocolo eficiente de transformación estable vía embriogénesis somática directa para la obtención de variedades comerciales de caña de azúcar requiere de la optimización de múltiples parámetros.

El bombardeo de micropartículas es un método eficiente para la producción de plantas transgénicas estables de caña de azúcar (Guo *et al.*, 2014) en comparación con otras técnicas. Los principales factores que afectan este método son el tipo de partícula, la naturaleza de los explantos, la concentración y calidad de ADN, el nivel de presión del sistema y la distancia entre el bombardeo y el tejido objetivo. En el estudio actual se evaluaron partículas de oro y de tungsteno, siendo las primeras las de mayor eficacia para la obtención de eventos transgénicos. En los explantos transformados con oro se observó una eficiencia de transformación 10 veces mayor que con el tungsteno, lo cual podría deberse a las propiedades físicas de las primeras que no tienden a aglomerarse (Altpeter and Sandhu, 2010), lo cual sí ocurre con las partículas de tungsteno. Esto es acorde a lo mencionado por Bhatnagar *et al.* (2002), quienes enunciaron que la eficiencia de transformación con partículas de oro es tres veces mayor comparada con las partículas de tungsteno, aduciendo que el bajo porcentaje de explantos GUS positivos con tungsteno podría deberse al efecto tóxico del mismo. Así también, Russell *et al.* (1992) afirmaron que el menor número de transformantes obtenidos con partículas de tungsteno podría deberse a la toxicidad de las mismas, que actúan contribuyendo a la lesión celular. Aunque este último resultado demuestre que altas concentraciones de tungsteno pueden ser perjudiciales, la sensibilidad de las células a ese elemento parece diferir entre los diferentes organismos. En este sentido, en el caso de tabaco, Hunold *et al.* (1994) no encontraron una mayor toxicidad del tungsteno en comparación con el oro, ni una menor proporción de transformantes estables al bombardear hojas de plantas de tabaco.

Investigaciones sobre el tiempo óptimo del cultivo previo a la transformación sugirieron que con el cultivo del explanto inmaduro de siete días se logró la mayor eficiencia de transformación (Snyman *et al.*, 2006; Van Der Vyver, 2010). En el presente estudio, la transferencia de ADN se realizó luego de 10 días de iniciado el cultivo con un subcultivo previo en el día 7. Este subcultivo permitió la eliminación de los discos de hojas que mostraron contaminación o necrosis. Estos resultados fueron consistentes con los descritos por Taparia *et al.* (2012), quienes sugirieron además que la eficiencia de transformación observada por disparo es diez veces mayor que las informadas por Snyman *et al.* (2006). Por otro lado, respecto a las cantidades de ADN evaluadas (2,5 y 5 µg) en el presente estudio, se concluyó que ambas podrían utilizarse sin afectar la eficiencia de transformación. Estos resultados contrastan con los expuestos por Christou and Ford (1995), quienes sugieren que la introducción de grandes cantidades de ADN en las células vegetales produce una alta expresión transitoria, pero reduce la eficiencia de la transformación estable. A la vez, Anunanthini *et al.* (2017) informaron que una baja cantidad de ADN podría contribuir a la obtención de plantas transgénicas con un bajo número de copias.

En el presente trabajo se optimizó un protocolo para la transformación genética de caña de azúcar desde la producción de embriones somáticos directos hasta el proceso de transformación. Este protocolo contribuiría a disminuir el tiempo de obtención de plantas transgénicas comerciales, haciendo más eficaz el proceso de desregulación de una variedad transgénica de caña de azúcar.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se optimizó un protocolo eficiente para la transformación genética estable de embriones somáticos directos de caña de azúcar mediante el uso combinado de partículas de oro, discos de hojas de 10 días como explanto y 2,5 µg de ADN. El uso de estos parámetros ajustados podría incrementar la eficiencia de la transformación genética de las variedades locales de caña de azúcar mediante la técnica de embriogénesis somática directa.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Altpeter, F. and S. Sandhu. 2010.** Genetic transformation—biolistics. *Plant Cell Culture: Essential Methods*: 217–239.
- Anunanthini, P.; S. R. Kumar and R. Sathishkumar. 2017.** Factors affecting genetic transformation efficiency in sugarcane. En: *Sugarcane biotechnology: challenges and prospects*. Springer, Cham, pp. 61–73.
- Arencibia, A.; E. Carmona; P. Tellez; M. T. Chan; S. M. Yu; L. Trujillo and P. Oramas. 1998.** An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* 7:213–222
- Bhatnagar, S.; A. Kapur and P. Khurana. 2002.** Evaluation of parameters for high efficiency gene transfer via particle bombardment in Indian mulberry *Morusindica* cv. K2: A time phased screening strategy. *Plant Cell Report* 21: 669–675.
- Bower, R. and R. G. Birch. 1992.** Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *The Plant Journal* 2(3): 409–416.
- Bower, R.; A. R. Elliott; B. A. Potier and R. G. Birch. 1996.** High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Molecular Breeding* 2(3): 239–249.
- Chen, W.H.; K. M. A Gartland; M. R. Davey; R. Sotak; J. S. Gartland; B. J. Mulligan; J. B. Power and E. C. Cocking. 1987.** Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene. *Plant Cell Reports* 6(4): 297–301.
- Christou, P. and T. Ford. 1995.** Parameters influencing stable transformation of rice immature embryos and recovery of transgenic plants using electric discharge particle acceleration. *Annals of Botany* 75(4): 407–413.
- Cursi, D.E.; H. P. Hoffmann; G. V. S. Barbosa; J. A. Bressiani; R. Gazaffi; R. G. Chapola et al. 2021.** History and Current Status of Sugarcane Breeding,

- Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. *SugarTech*: 1–22. doi:10.1007/s12355-021-00951-1.
- Di Rienzo, J. A.; F. Casanoves y M. G. Balzarini. 2018.** InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [En línea] Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Elliott, A. R.; J. A. Campbell; R. I. S. Bretell and C. P. L. Grof. 1998.** Agrobacterium mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. *Australian Journal of Plant Physiology* 25:739–743.
- Enriquez-Obregon, G.A.; P. R. I. Vázquez; S. D. L. Prieto; A. D. L. Riva-Gustavo and H. G. Selman. 1998.** Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by Agrobacterium-mediated transformation. *Planta* 206:20–27.
- Gallo-Meagher, M. and J. E. Irvine. 1996.** Herbicide-resistant sugarcane containing the bar gene. *Crop Science* 36:1367–1374.
- Gambley, R.L.; J. D. Bryant; N. P. Maseland G. R. Smith. 1994.** Cytokinin enhanced regeneration of plants from microprojectile bombarded sugarcane meristematic tissue. *Australian Journal of Plant Physiology* 21(5):603–612.
- Ghorbel, R.; J. Juárez; L. Navarro and L. Pena. 1999.** Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theoretical and Applied Genetics* 99(1-2): 350-358.
- Guo, J.L.; H. Ling; Q. B. Wu; L. P. Xu and Y. X. Que. 2014.** The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Science Report* 4:7042.
- Hatch, M. D. 2005.** C4 photosynthesis: discovery and resolution. In: *Discoveries in Photosynthesis*. Govindjee; J. T. Beatty; H. Gest and J. F. Allen (Eds.) (Dordrecht: Springer), pp. 875–880.
- Herrera-Estrella, L.; M. De Block; E. Messens; H. P. Hernalsteens; M. Van Montagu and J. Schell. 1983.** Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal* 2 (6): 987-995.
- Hunold, R.; R. Bronner and G. Hahne. 1994.** Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *The Plant Journal* 5(4): 593-604.
- Kremers, G.J.; S. G. Gilbert; P. J. Cranfill; M. W. Davidson and D. W. Piston. 2011.** Fluorescent proteins at a glance. *Journal Cell Science* 124(2): 157-160.
- Millwood, R.J.; H. S. Moon. and C. N. Stewart. 2008.** Fluorescent proteins in transgenic plants. In: *Reviews in fluorescence*. Springer, New York, N.Y., pp. 387-403.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Nerkar, G.; A. Thorat; S. Sheelavantmath; H. B. Kassa and R. Devarumath. 2018.** Genetic Transformation of Sugarcane and Field Performance of Transgenic Sugarcane. In: Gosal S., Wani S. (eds) *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2*. Springer Cham.
- Noguera, A.; R. Enrique; M. F. Perera; S. Ostengo; J. Racedo; D. Costilla; S. Zossi; M. I. Cuenya; M. P. Filippone; B. Welin and A. P. Castagnaro. 2015.** Genetic characterization and field evaluation to recover parental phenotype in transgenic sugarcane: a step toward commercial release. *Molecular Breeding* 35 (5): 115.
- OECD-FAO Agricultural Outlook, OECD Agriculture statistics (data base). 2018.** <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>. (consultado 08/08/20).
- Ostengo, S.; G. Serino; M. F. Perera; J. Racedo; S. Y. Mamaní González; F. Yáñez Cornejo and M. I. Cuenya. 2021.** Sugarcane breeding, germoplasm development and supporting genetic research in Argentina. *Sugar Tech*: 1-15.
- Russell, J. A.; M. K. Roy and J. C. Sanford. 1992.** Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiology* 98 (3): 1050-1056.
- Shaner, N. C.; P. A. Steinbach and R. Y. Tsien. 2005.** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods* 2(12): 905.
- Snyman, S. J.; M. P. Watt; B. I. Hockett and F. C. Botha. 2000.** Direct somatic embryogenesis for rapid, cost effective production of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. *hybrids*). *Proceeding South African Sugar Technology Association* 74: 186-187.
- Snyman, S.; G. Meyer; J. Richards; N. Haricharan; S. Ramgareeb and B. Hockett. 2006.** Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cell Report* 25: 1016–1023.
- Sun, S.S.M.; A. Marezki; C. Nagai; K. Houtchens and D. Bidney D. 1993.** Transformation of *Saccharum spontaneum* by particle bombardment. *Sugarcane* 5:1–7.
- Taparia, Y.; M. Gallo and F. Altpeter. 2012.** Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 111(2): 131-141.
- Thirugnanasambandam, P. P.; N. V. Hoang and R. J. Henry. 2018.** The challenge of analyzing the sugarcane genome. *Frontiers in plant science* 9: 616.
- Van Der Vyver, C. 2010.** Genetic transformation of the euploid *Saccharum officinarum* via direct and indirect embryogenesis. *Sugar Technology* 12: 21-25.