



# Transformación y edición genética de la caña de azúcar

Agroindustria de la caña de azúcar en Colombia





López Gerena, Jershon

Transformación y edición genética de la caña de azúcar / Jershon López Gerena; Hugo Arley Jaimes Quiñones. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Ed.) -- Cali: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia, 2023.

38 p. (Agroindustria de la caña de azúcar en Colombia)

Incluye referencias bibliográficas

ISBN 978-958-8449-30-2

1. Caña de azúcar. 2. Transformación genética. 3. Edición genética. 4. Biobalística. 5. Agrobacterium tumefaciens. 6. CRISPR-Cas9

I. Jaimes Quiñones, Hugo Arley. II. Título. III. Agroindustria de la caña en Colombia

633.61 CDD 23 ed.

L864

Cenicaña – Biblioteca Guillermo Ramos Núñez

Cenicaña © 2023

Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia

Calle 38 norte No. 3CN-75. Cali, Valle del Cauca, Colombia

Estación experimental: San Antonio de los Caballeros, vía Cali-Florida km 26

[www.cenicana.org](http://www.cenicana.org)

Producción editorial: Servicio de Cooperación Técnica y Transferencia de Tecnología

Coordinación editorial: Victoria Carrillo C.

Corrección de textos: Ernesto Fernández R.

Diseño e ilustración: Alcira Arias V.

Cita bibliográfica

López Gerena, J. & Jaimes Quiñones, H. A. (2023). Transformación y edición genética de la caña de azúcar. En: Centro de investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Ed). Agroindustria de la caña de azúcar en Colombia. Cenicaña.

# Transformación y edición genética de la caña de azúcar

Jershon López-Gerena

Hugo Arley Jaimes Quiñones





## Contenido

Introducción .....	4
Generalidades .....	6
Transformación genética de la caña de azúcar .....	8
Edición genética de la caña de azúcar .....	18
Conclusiones y perspectivas futuras .....	24
Referencias bibliográficas .....	26

## Introducción

En las últimas dos décadas se han incrementado las investigaciones orientadas a desarrollar herramientas biotecnológicas en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) para evaluar factores como el contenido de sacarosa de la caña, las toneladas de caña obtenidas por hectárea (TCH) y su resistencia al estrés biótico y abiótico, mediante el cultivo de tejidos y la ingeniería genética. Ese enfoque se refleja en la mejora de los indicadores de productividad del cultivo. La producción mundial de azúcar y bioetanol, así como el uso de la caña de azúcar como biofábrica plantean la necesidad de una producción sostenible, lo cual exige investigar exhaustivamente los factores que inciden en el mejoramiento del cultivo para contrarrestar las adversidades del cambio climático, que impactan directamente en la productividad del cultivo. Estas mejoras genéticas –en cualquier especie–, especialmente para rasgos de herencia cuantitativa, serán exitosas solo cuando se cuente con métodos eficientes de transferencia o edición de genes y regeneración de plantas completas.

Este capítulo discute los avances recientes en los métodos de transformación de la caña de azúcar, en especial la biobalística y la mediada por *Agrobacterium* en el sistema monocotiledóneo de *Saccharum* spp. Además, relaciona hallazgos ya aplicados en la caña de azúcar, como las nuevas técnicas de edición genética basadas en nucleasas efectoras TALEN, así como la más reciente metodología –que augura una mayor aplicación en plantas– de edición genética usando el sistema CRISPR–Cas9 (repeticiones palindrómicas agrupadas y regularmente espaciadas). Aplicar estos avances en la caña de azúcar requiere un método de transformación eficiente que incluya en el mediano plazo un sistema de edición genética libre de ADN, para que las variedades resultantes sean consideradas como cultivares convencionales y no modificadas, como lo dispone la Resolución 29299 de agosto de 2018 del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).



## Generalidades

La transferencia genética tiene un importante papel en la aplicación de la biotecnología como complemento al mejoramiento de los cultivos, desde los estudios básicos hasta el desarrollo de variedades comerciales. La disección de procesos biológicos a escala molecular en las plantas, el estudio de los efectos genéticos, la regulación adecuada de transgenes y la generación robusta de eventos transgénicos para su comercialización en un cultivo de interés serían posibles de manera efectiva si el genoma de un cultivo determinado se pudiera transformar o, mejor aun, editar con alta eficiencia.

El cruzamiento es la forma más común de obtener variabilidad genética en el proceso de mejoramiento genético. Sin embargo, este método tiene restricciones pues el cruzamiento solo es factible en algunos casos entre individuos de la misma especie o género, como sucede con la caña de azúcar.

A partir de 1888, cuando se obtuvieron los primeros resultados en los programas de mejoramiento de la caña de azúcar, se han logrado grandes avances en el mundo en lo relacionado con el aumento de las toneladas de caña por hectárea, el contenido de sacarosa, la resistencia a enfermedades y plagas y la regeneración a partir de la soca, manteniendo niveles razonables de fibra (Moore, Paterson & Tew, 2013). Sin embargo, aspectos de la caña de azúcar tales como una base genética estrecha, un genoma grande (~10Gb) y altamente complejo (poliploidía, aneuploidía y secuencias repetitivas), su poca fertilidad y los extensos ciclos de selección que conllevan los nuevos cruzamientos (10-12 años) hacen que el proceso de mejoramiento genético de la caña sea mucho más lento en comparación con otros cultivos de importancia agronómica cuyo ciclo es de aproximadamente 4-6 meses, como el arroz, el trigo y el maíz (Altpeter & Oraby, 2010). La modificación genética y la edición genómica de la caña de azúcar mediante técnicas de ingeniería genética son una opción viable para contribuir en



el proceso de mejoramiento para la introducción de nuevas características de interés o a la modulación de las ya existentes, con el fin de reducir el tiempo de obtención de nuevas variedades partiendo de materiales mejorados (o en proceso de mejoramiento), superando con ello las barreras para cruzamientos amplios y la poca diversidad del acervo genético.

La caña de azúcar es una planta C4 con una alta tasa de conversión de la luz solar en biomasa y sacarosa y su propagación es vegetativa; además el polen que produce es de baja viabilidad, por lo cual para persistir depende totalmente de condiciones de cultivo adecuadas. Esto hace de la caña de azúcar un cultivo ideal para la modificación genética y la edición genómica, con una alta probabilidad de que las secuencias introducidas sean estables (Altpeter & Oraby, 2010; Beyene et al., 2013). Un aspecto fundamental que ha permitido la aplicación de metodologías de modificación genética en la caña de azúcar es el desarrollo desde hace casi cincuenta años de sistemas de cultivo de tejidos confiables para regenerar plantas a partir de tejido embriogénico (Barba & Nickell, 1969; Heinz & Mee, 1969).

Los modernos cultivares de caña de azúcar son híbridos interespecíficos con alto nivel de ploidía, lo que dificulta el mejoramiento genético convencional debido a la compleja base genética del cultivo. Esta característica ha obligado a desarrollar nuevos sistemas de mejoramiento utilizando la ingeniería genética, con el fin de introducir genes de interés en variedades o híbridos comerciales (Lakshamanan et al., 2005). Actualmente, mediante la integración de diferentes estrategias de la biología molecular y del mejoramiento convencional, es posible mejorar las principales características de importancia económica de la caña de azúcar y desarrollar nuevas variedades con los rasgos deseados, a fin de enfrentar el desafío competitivo global que se le plantea al sector azucarero y las adversidades del inminente cambio climático.

## Transformación genética de la caña de azúcar

Para desarrollar cultivos genéticamente modificados con un sistema de transferencia de genes apropiado es necesario un protocolo de cultivo de tejidos vegetales confiable y reproducible. A diferencia de las plantas monocotiledóneas, el cultivo de tejidos y los métodos de transformación genética están bien establecidos en la mayoría de las dicotiledóneas debido a su capacidad de respuesta *in vitro*. En contraste, las monocotiledóneas, entre ellas la caña de azúcar, generalmente requieren un método riguroso y la optimización de diversos factores para la transmisión eficiente del gen deseado y la selección acertada de transformantes positivos.

El cultivo de tejidos se ha usado ampliamente en caña de azúcar para múltiples objetivos, tales como evaluar el metabolismo de la sacarosa, determinar la resistencia de la caña a las enfermedades, micropropagar variedades élites, mantener bancos de germoplasma *in vitro*, producir variabilidad genética, generar haploides sintéticos y modificar genéticamente la planta (Birch, 2013). Lo anterior revela la plasticidad que tiene la caña de azúcar para tomar vías morfogenéticas directas e indirectas a partir de meristemos existentes (ápices y yemas axilares) o regeneración de novo (tejido foliar joven), tanto por la ruta de la embriogénesis somática como por la de la organogénesis (Figura 1) (Snyman, 2004).

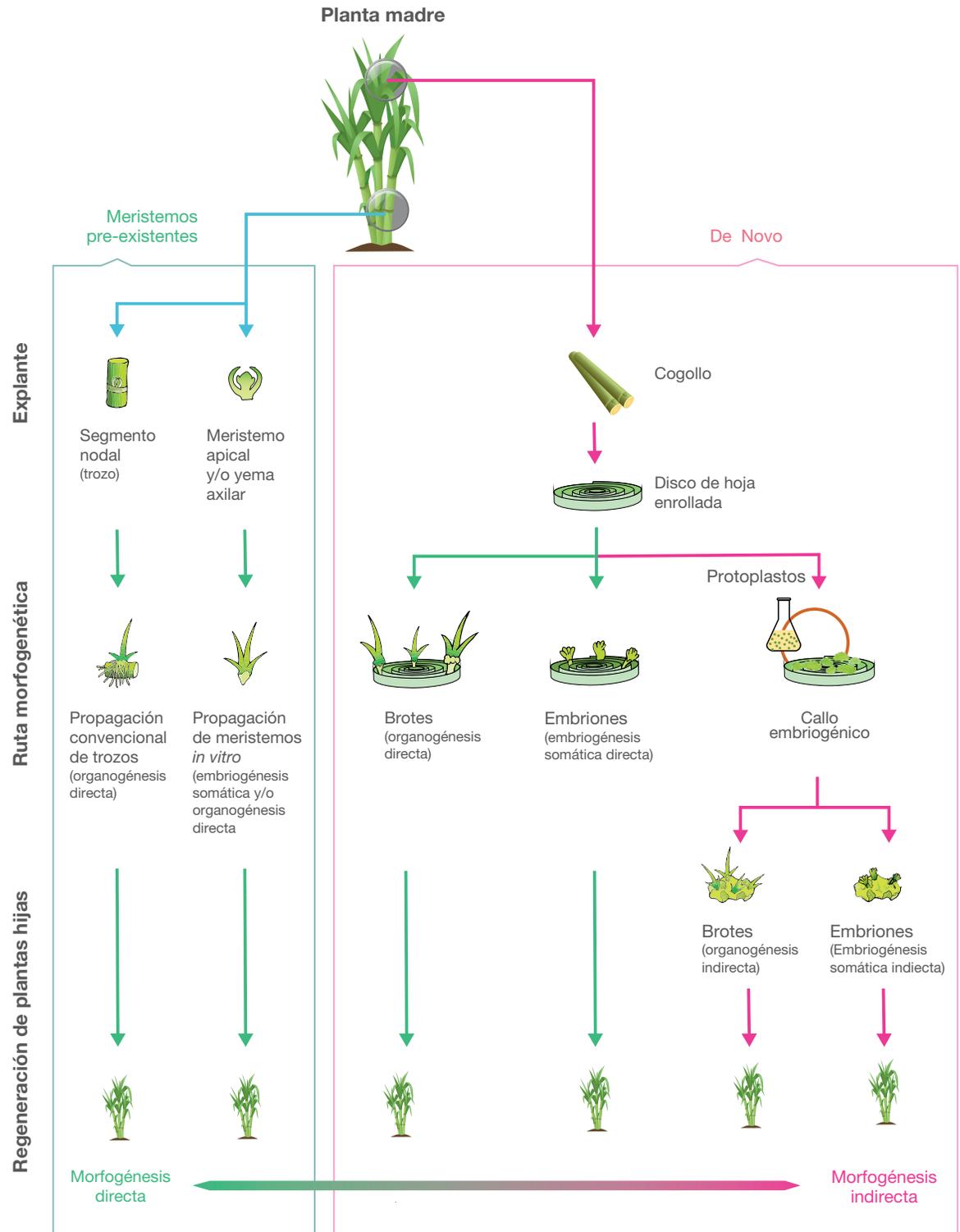
### Métodos de transformación en caña de azúcar

La búsqueda de métodos para la transferencia de ADN a las células de la caña de azúcar con mayor reproducibilidad estimuló en la década de 1990 el desarrollo de las técnicas de bombardeo con micropartículas o biobalística (Bower & Birch, 1992) y el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Arencibia et al., 1998; Enríquez-Obregón

et al., 1998), que han sido las prevalentes desde entonces en diversos aspectos relacionados con el establecimiento y optimización de protocolos, resistencia a enfermedades (bacterianas, virales y fúngicas), resistencia a plagas (insectos), resistencia a herbicidas, características de interés agronómico (floración, uso eficiente del agua y del nitrógeno, metabolismo del etileno y tolerancia a sales), aumento en la producción de sacarosa, producción de azúcares derivados, obtención de biocombustibles y generación de otros productos de alto valor agregado (Cuadro 1).



Una transformación exitosa depende de numerosos factores. En este propósito es muy importante tener en cuenta aspectos como el genotipo de la caña de azúcar, la cepa de *Agrobacterium*, el tipo de vector, el método de transformación y las condiciones del cultivo.



**Figura 1.** Rutas morfológicas de regeneración que ocurren en la caña de azúcar de acuerdo con las principales técnicas de propagación vegetativa utilizadas en condiciones *in vitro* (cultivo de tejidos) y *ex vitro* (Birch, 2013; Snyman, 2004).

**Cuadro 1.** Estudios relevantes realizados en la modificación genética de la caña de azúcar.

Característica	Gen de interés	Tejido blanco	Técnica de transferencia	Referencia
<b>Establecimiento y optimización de protocolos</b>				
β-glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	Electroporación	(Arencibia et al., 1992)
β-glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Bower & Birch, 1992)
β -glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	Electroporación	(Arencibia et al., 1995)
β-glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Yemas axilares (MD)	Biobalística	(Gambley, Ford & Smith 1993)
Luciferasa, antocianina, β-glucoronidasa (Reportero)	<i>luc, ant, uid (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Bower, Elliott, Potier & Birch, 1996)
β-glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Enríquez-Obregón et al., 1998)
Proteína verde fluorescente (Reportero)	<i>gfp</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística y <i>A. tumefaciens</i>	(Elliott et al., 1999)
β-glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Joyce et al., 2014, 2010)
Luciferasa (Reportero)	<i>luc</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Anderson & Birch, 2012)
Resistencia a geneticina (Selección)	<i>nptII</i>	Callo embriogénico (ESI) y discos de hojas enrolladas (ESD)	Biobalística	(Taparia, Fouad, et al., 2012; Taparia, Gallo & Altpeter, 2012)
Resistencia a clorsulfuron (Selección)	<i>als</i>	Callo embriogénico (ESI) y discos de hojas enrolladas (ESD)	Biobalística	(Dermawan et al., 2016; Vyver, Conradie, Kossmann & Lloyd, 2013)
Proteínas fluorescentes (Reportero)	<i>gfp</i> y <i>cfp</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Dong et al., 2014)
β -glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Kinkema et al., 2014)
Degradación de manosa y resistencia a glufofosinato de amonio, higromicina y geneticina (Selección)	<i>pml, bar, hptII, nptII</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2015)
Resistencia a fomesafen (Selección)	<i>PPOX</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(van Beek et al., 2018)
β -glucoronidasa (Reportero)	<i>uidA (gus)</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Ramasamy et al., 2018)
Resistencia a geneticina (Selección)	<i>nptII</i>	Callo embriogénico (ESI) y discos de hojas enrolladas (ESD)	Biobalística y <i>A. tumefaciens</i>	(Zhao et al., 2019)
<b>Resistencia a enfermedades</b>				
Resistencia a SCMV	SCMV-CP sentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Joyce et al., 1998)
Resistencia a <i>Xanthomonas albilineans</i> (Ashby) Dowson (Escaldadura de la hoja)	<i>albD</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(L. Zhang, Xu, & Birch, 1999)
Resistencia a SrMV	SrMV-CP sentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Ingelbrecht, Irvine, & Mirkov, 1999)

**Cuadro 1.** Continuación.

Característica	Gen de interés	Tejido blanco	Técnica de transferencia	Referencia
Resistencia al virus de la enfermedad de Fiji	FDVS9 ORF	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(McQualter et al., 2004)
Resistencia a SCMV	SCMV-CP sentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Gilbert et al., 2005)
Resistencia a SCMV	SCMV-CP sentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Jain et al., 2007)
Resistencia a SCYLV	SCYLV-CP antisentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Gilbert, et al., 2009)
Resistencia a SCYLV	SCYLV-CP sentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Zhu et al., 2011)
Resistencia a SCMV	SCMV-CP sentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Yao et al., 2017)
Resistencia a <i>Colletotrichum falcatum</i> Went (Pudrición roja)	Gen de $\beta$ -1,3-glucanasa	Yemas axilares (MD)	<i>A. tumefaciens</i>	(Nayyar et al., 2017)
Resistencia a SCMV	SCMV-CP RNAi	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Aslam et al., 2018)
<b>Resistencia a plagas (insectos)</b>				
Resistencia a <i>Diatraea saccharalis</i> (Barrenador de los tallos)	<i>Cry1Ab</i>	Callo embriogénico (ESI)	Electroporación	(Arencibia et al., 1999; Arcencibia et al., 1997)
Resistencia a <i>Diatraea saccharalis</i> (Barrenador de los tallos)	<i>Cry1Ab</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Braga et al., 2003)
Resistencia a <i>Diatraea saccharalis</i> (Barrenador de los tallos)	<i>Cry1Ac</i> (Optimizado)	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Gao et al., 2016; Weng et al., 2011, 2006)
Resistencia a <i>Ceratovacuna lanigera</i> (Áfido lanudo)	<i>gna</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Zhangsun, Luo, Chen, & Tang, 2007)
Resistencia a <i>Scirpophaga excerptalis</i> (Barrenador del brote)	<i>Aprotinina</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Christy et al., 2009)
Resistencia a <i>Chilo infuscatellus</i> (Barrenador del vástago de caña)	<i>Aprotinina</i> , <i>Cry1Ab</i> (Optimizado)	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística y <i>A. tumefaciens</i>	(Arvinth et al., 2010)
Resistencia a <i>Sphenophorus levis</i> (Picudo de la caña)	<i>CaneCPI-1</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Schneider et al., 2017)
Resistencia a <i>Diatraea saccharalis</i> (Barrenador de los tallos)	<i>Cry1Ab</i> , <i>Cry2Ab</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Cristofolletti et al., 2018)

Continúa

**Cuadro 1.** Continuación.

Característica	Gen de interés	Tejido blanco	Técnica de transferencia	Referencia
<b>Resistencia a herbicidas</b>				
Resistencia a glufosinato de amonio	<i>bar</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Gallo-Meagher & Irvine, 1996)
Resistencia a glufosinato de amonio	<i>bar</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Falco, Tulmann Neto, & Ulian, 2000)
Resistencia a glufosinato de amonio	<i>bar</i>	Yemas axilares (MD)	<i>A. tumefaciens</i>	(Manickavasagam et al., 2004)
Resistencia a glifosato	<i>cp4</i>	Discos de hojas enrolladas (ESD)	Biobalística	(Snyman et al., 2006)
Resistencia a glufosinato de amonio	<i>bar</i>	Semilla sexual (MD)	<i>A. tumefaciens</i>	(Mayavan et al., 2013)
Resistencia a glufosinato de amonio	<i>bar</i>	Yemas axilares (MD)	<i>A. tumefaciens</i>	(Mayavan et al., 2015)
Resistencia a glufosinato de amonio	<i>bar</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Wang et al., 2017)
<b>Interés agronómico</b>				
Tolerancia a sequía	<i>GFTSase</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Shu-Zhen et al., 2006; Wang, et al., 2005)
Tolerancia a sequía	<i>VaP5CS</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Molinari et al., 2007)
Tolerancia a sequía	<i>AtCBF4</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(McQualter & Dookun-Saumtally, 2007)
Tolerancia a sequía	<i>dreb2b</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Wu et al., 2008)
Metabolismo del etileno	<i>Aco</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Wang et al., 2009)
Tolerancia a sales	<i>VaP5CS</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Guerzoni et al., 2014)
Tolerancia a sequía	<i>AtDREB2A CA</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Reis et al., 2014)
Tolerancia a sequía y a sales	<i>EaHSP70</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Augustine et al., 2015)
Uso eficiente del nitrógeno	<i>HvAlaAT</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Snyman et al., 2015)
Tolerancia a sequía	<i>SoP5CS</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i>	(Li et al., 2018)
<b>Producción de sacarosa</b>				
Reducción de la invertasa ácida soluble	<i>SAI</i> antisentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Ma et al., 2000)
Reducción de la invertasa ácida soluble	<i>SAI</i> antisentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Botha, Sawyer & Birch, 2001)
Azúcar y jugo oscuro	<i>PPO</i> sentido/antisentido	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Vickers et al., 2005)
Alteración en la producción de azúcar	<i>PPO</i> sentido/antisentido y <i>SoSPS</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Vickers et al., 2005)

Cuadro 1. Continuación.

Característica	Gen de interés	Tejido blanco	Técnica de transferencia	Referencia
Reducción en la acumulación de almidón	<i>AGPase RNAi y -amylase</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Ferreira, Kossmann, Lloyd & Groenewald, 2008)
Acumulación de sacarosa	<i>PFP sentido/ antisentido</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Groenewald & Botha, 2008)
Reducción de la invertasa neutra	<i>NI antisentido</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Rossouw et al., 2007; Rossouw et al., 2010)
<b>Azúcares derivados</b>				
Acumulación de sorbitol	<i>mds6pdh y zmgk</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Chong et al., 2007)
Acumulación de trehalosa	<i>mutB</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Hamerli & Birch, 2011)
Acumulación de Isomaltulosa	<i>UQ68J SI</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Basnayake et al., 2012; Mudge et al., 2013; Wu & Birch, 2007)
<b>Biocombustibles</b>				
Síntesis enzimas celulolíticas	<i>(CBH I), CBH II y EG</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Hall et al., 2013; Harrison et al., 2011)
Producción de etanol lignocelulósico	<i>COMT RNAi</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Jung et al., 2012; Jung et al., 2013)
Producción de etanol lignocelulósico	<i>xy10B (Optimizado)</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Kim et al., 2016)
Producción de triacilglicerol	<i>WRI1, DGAT1-2, OLE1 (Optimizados) y PXA1/AGP RNAi</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Zale et al., 2016)
Producción de etanol lignocelulósico	<i>Sh4CL1 RNAi</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística (Intragénesis)	(Jung et al., 2016)
Producción de etanol lignocelulósico	<i>pTALCOMT</i>	Callo embriogénico (ESI)	<i>A. tumefaciens</i> (EG/TALEN)	(Jung & Altpeter, 2016); (Kannan et al., 2018)
<b>Productos de alto valor agregado</b>				
Síntesis de pHBA	<i>hchl y cpl</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(McQualter et al., 2005)
Citokina humana (GM-CSF)	<i>GM-CSF</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Wang et al., 2005)
Síntesis de canecistatina	<i>CaneCPI-1</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Ribeiro et al., 2008)
Síntesis de avidina	<i>avd</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Jackson et al., 2010)
Síntesis de PHA	<i>phbA, phbB, phaC2, phaJ2, FatB2 y KasA1</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Anderson et al., 2011)
Síntesis de PHB	<i>phaA, phaB y phaC</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Petrasovits et al., 2013)
Síntesis de Lisozima bovina	<i>BvLzm (Optimizado)</i>	Callo embriogénico (ESI)	Biobalística	(Barros et al., 2013)

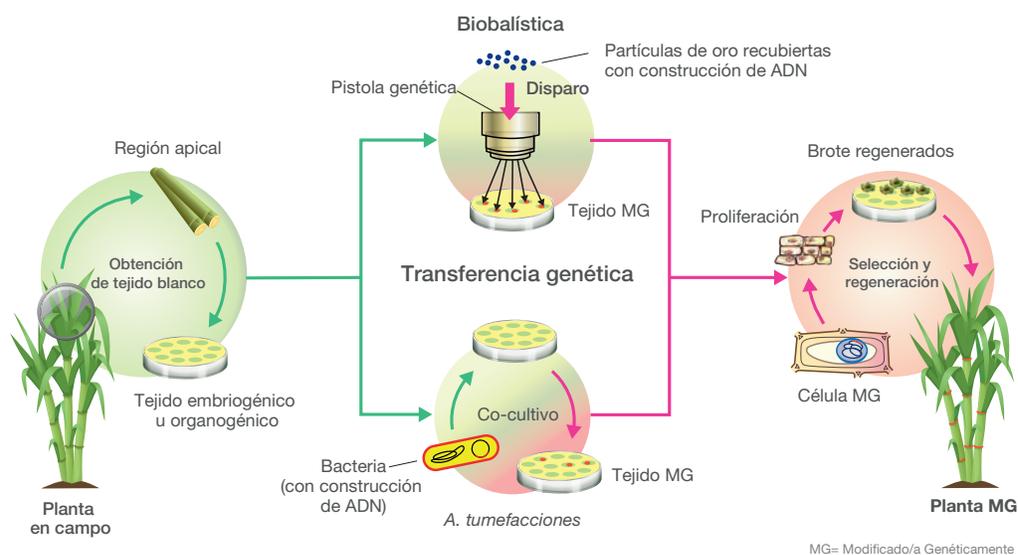
ESI= Embriogénesis somática indirecta. ESD= Embriogénesis somática directa. MD= Morfogénesis directa. EG= Edición genómica

En la **Figura 2** se muestra el esquema general de los dos métodos de transformación genética empleados en caña y utilizados en Cenicaña tanto para biobalística como para *Agrobacterium tumefaciens*.

Una transformación exitosa depende de numerosos factores. En este propósito es muy importante tener en cuenta aspectos como el genotipo de la caña de azúcar, la cepa de *Agrobacterium*, el tipo de vector, el método de transformación (biobalística o *Agrobacterium*) y las condiciones del cultivo. Adicionalmente, juegan papel importante en una efectiva transformación el uso de callos embriogénicos o brotes auxiliares, la edad y el tipo de explante de caña utilizado (Arencibia et al., 1998) y un sistema reportero eficiente como el obtenido con los genes Gus y GFP (Elliott et al., 1999). Joyce et al. (2010) registraron que el medio de cocultivo y el sistema de selección son críticos en la transformación mediada por *Agrobacterium*. El éxito de un proto-

colo de transformación genética depende de su eficiencia en la integración transgénica y posterior expresión de dicho gene(s) sobre la característica deseada, el número de copias integradas y su estabilidad en las generaciones posteriores.

En la búsqueda de la mayor eficiencia al menor costo en la transformación de la caña de azúcar se han adelantado en las últimas tres décadas numerosas investigaciones. Como resultado de ellas, se han transferido a la caña de azúcar varios genes usando diversos métodos, entre ellos el bombardeo de micropartículas (biobalística), la transformación mediada por *Agrobacterium*, la electroporación y el tratamiento con polietilenglicol. Prioritariamente se han utilizado los dos primeros métodos, cuyo éxito ha sido reportado por miembros del Consorcio Internacional de Biotecnología de Caña (ICSB, *International Consortium for Sugarcane Biotechnology*) y por la comunidad científica que trabaja en aplicaciones de biotecnología en este cultivo.



**Figura 2.** Diagrama general del proceso de modificación genética de la caña mediante el uso de biobalística y *A. tumefaciens*, que resalta las tres etapas principales: 1. Obtención del tejido blanco; 2. Transferencia genética; 3. Selección y regeneración. Si bien la vía más utilizada para la obtención del tejido blanco ha sido la morfogénesis indirecta para producir callo con capacidad embriogénica u organogénica, también se han diseñado protocolos rápidos para la obtención de plantas a través de la embriogénesis somática y organogénesis directa, a partir de secciones transversales de hojas jóvenes enrolladas (Snyman et al., 2006; Taparia et al., 2012; van der Vyver, 2010), así como de yemas axilares y semillas sexuales (Gambley, Ford & Smith, 1993; Manickavasagam et al., 2004; Mayavan et al., 2015).

Los primeros ensayos de modificación genética en caña de azúcar se llevaron a cabo mediante el tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (Chen et al., 1987) y la electroporación (Chowdhury & Vasil, 1992; Rathus & Birch, 1992), basándose en la amplia investigación realizada en cultivo de tejidos, pero las dificultades en la regeneración a partir de protoplastos impidieron la obtención de plantas. Los primeros resultados positivos con plantas de caña de azúcar modificadas genéticamente fueron obtenidos para el gen reportero de la  $\beta$ -Glucuronidasa y la resistencia al barrenador del tallo *Diatraea* spp. utilizando la técnica de la electroporación, pero reemplazando los protoplastos por callo embriogénico como el tejido blanco, para aprovechar la alta capacidad regenerativa de las células embriogénicas intactas de este tipo de tejido (Arencibia et al., 1992; Arencibia et al., 1995).

### Transformación mediada por bombardeo de micropartículas

Una de las técnicas que se utilizan más a menudo para la transformación de plantas –en especial los cereales y las gramíneas– es el bombardeo de micropartículas, o biobalística, mediante transferencia física directa de genes, que fue desarrollada por Sanford (1990). El bombardeo de micropartículas es un método directo de transformación genética por el cual se adhieren al ADN de interés a microproyectiles de oro o de tungsteno de 0.5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, para posteriormente ser acelerados con alta presión e introducir dicho ADN en células vegetales. De este modo pueden ser introducidos en la célula un fragmento de ADN o un gen completo. El ADN se difunde desde las partículas y puede ser expresado transitoriamente e incluso incorporado establemente en el genoma de la planta.

El bombardeo de micropartículas es una técnica de transformación que presenta varias ventajas sobre los otros sistemas. En primer lugar, en este sistema la transferencia del ADN es un proceso netamente físico y no requiere que haya interacciones biológicas para introducirlo en las células, a diferencia de otros métodos de transfe-

rencia que necesitan para ello la mediación de un vector biológico, como es el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, que tiene limitaciones genotipo dependientes. La biobalística no requiere ningún vector intrínseco, y en algunos casos se han utilizado cassetes mínimos de expresión (Taparia et al., 2012). Es una técnica simple y aplicable a una amplia gama de tejidos destinados a la transformación de la caña de azúcar (Joyce et al., 2014, Lakshamanan et al., 2005, Rathus & Birch, 1992). Adicionalmente, la transformación mediada por biobalística puede ser aplicable a través de embriogénesis somática directa o embriogénesis somática indirecta usando callo embriogénico de caña (Taparia et al., 2012). De otra parte, la biobalística tiene pocos aspectos negativos en relación con otros métodos de transformación genética, razón por la cual esta ha sido hasta el momento la técnica más popular y exitosa para la transformación de la caña de azúcar (Joyce et al., 1998; Gao et al., 2016; Yao et al., 2017).

### Transformación de caña mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación genética mediada por la bacteria del suelo *A. tumefaciens* se ha utilizado en más de 90 especies de plantas, la mayoría de ellas dicotiledóneas. Sin embargo, el uso de acetosiringona en el medio de inoculación ha hecho posible que también las monocotiledóneas, incluida la caña de azúcar, puedan ser objeto de este método. La inserción de bajo número de copias hizo más popular esta metodología para su aplicación en transformación genética. La primera variedad de caña de azúcar modificada genéticamente usando *A. tumefaciens* la obtuvieron Arencibia et al. en 1998, quienes introdujeron en la planta un cassette super binario o cepa super virulenta, con un resultado que abrió las puertas a nuevos desarrollos e investigaciones que a la fecha reportan diferentes genes introducidos en genotipos de caña responsables de variables de importancia agronómica. Con base en este protocolo, se pueden producir líneas transformadas en un período de 6 a 8 meses. Ahora bien, varios aspectos críticos determinan la eficiencia de este método, entre ellos el genotipo, el sistema de co-

cultivo, el cassette, el marcador de selección, la eficiencia de regeneración y el uso de técnicas adicionales como filtración al vacío y promotores, recientemente estudiados (Joyce et al., 2014). En los últimos años se han reportado varias estrategias novedosas y técnicas mejoradas que harían más eficaz la transformación utilizando este protocolo.

En el Cuadro 1 se resumen algunos de los estudios sobre la modificación genética y más recientemente la edición genética de la caña de azúcar en relación con las aplicaciones mencionadas anteriormente.

Uno de los aspectos más relevantes de los últimos años en el campo del mejoramiento genético de la caña de azúcar mediante la aplicación de herramientas biotecnológicas fue la aprobación por primera vez para uso comercial de una variedad de caña de azúcar modificada genéticamente. Efectivamente, el 8 de junio de 2017 la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad (CTNBio) de Brasil la autorizó por considerarla muy segura tanto para la salud humana y animal como para el medio ambiente. La variedad, llamada CTC20BT, fue desarrollada por investigadores del Centro de Tecnología Canavieira (CTC) utilizando la técnica de biobalística y tiene como principal característica la expresión del gen Cry1Ab, originario de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que confiere a la planta resistencia contra el insecto *Diatraea saccharalis*, plaga de importancia económica para el cultivo pues ocasiona pérdidas cercanas a los cinco billones de reales por año en Brasil (ISAAA, 2017). Al poco tiempo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) autorizó la comercialización de esta nueva variedad para consumo humano y lo mismo hizo Canadá en abril de 2018 (Cheavegatti-Gianotto et al., 2019). Este fue un gran logro para la aplicación de la biotecnología agrícola en caña de azúcar y abrió nuevas oportunidades y mercados para utilizar la caña de azúcar modificada con genes de primera generación (como los genes Bt y los de resistencia a herbicidas) y en el mediano plazo producir caña modificada con genes de segunda generación que incrementen

algunos de los principales indicadores de productividad del cultivo, como sacarosa, TCH y le confieran tolerancia al estrés hídrico.

Es de resaltar que a pesar del gran número de publicaciones sobre la modificación genética de la caña de azúcar desde 1992, solo en 2018 la variedad de caña CTC20BT, transformada con el gen Cry1Ab para resistencia a *Diatraea saccharalis*, ha alcanzado la etapa de comercialización (Cheavegatti-Gianotto et al., 2019). Previamente en Indonesia, en 2013, hubo otro desarrollo de caña modificada genéticamente con tolerancia a la sequía; infortunadamente, su difusión se estancó por decisiones políticas (ISAAA, 2013). Este hecho revela que, si bien se ha alcanzado el conocimiento para superar muchos de los desafíos técnicos que plantea la biotecnología, factores asociados a la regulación, a la propiedad intelectual, a la percepción pública y a aspectos sociopolíticos específicos de cada país son determinantes para obtener en caña de azúcar el éxito logrado por esta técnica en otros cultivos como soja, maíz, algodón, canola, papaya y berenjena.

En Cenicaña se han establecido protocolos de modificación genética en variedades comerciales como CC 84-75, CC 85-92, CC 93-4418, CC 01-1228 y CC 01-1940 mediante el uso de dispositivos de biobalística y de la bacteria *A. tumefaciens*. El objetivo de estas investigaciones fue el desarrollo de variedades de caña con resistencia al virus de la hoja amarilla (SCYL) (Rangel et al., 2002; Rangel et al., 2005) y a los agentes causales de las enfermedades bacterianas raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) y escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) (Avellaneda & Victoria, 2008), así como la optimización de dispositivos y protocolos de transferencia genética (Bonilla, 2007; Bonilla, Muñoz & Ángel, 2008; Mosquera, 2011).

Tanto la técnica de biobalística como el uso de *A. tumefaciens* han demostrado ser superiores a metodologías menos confiables para la transferencia genética en caña de azúcar, pero en cada caso es necesario hacer ajustes con el fin de aumentar la posibilidad de éxito en la obtención de

plantas con los fenotipos esperados, dado que se deben producir cientos de eventos de modificación genética para que algunos pocos cumplan con el escrutinio molecular y fenotípico y se obtenga el impacto agronómico deseado. Actualmente, Cenicaña ha enfocado sus esfuerzos en ajustar las metodologías de transformación genética para aumentar su eficiencia e incrementar las posibilidades de obtener la expresión de los genes transferidos en las plantas de caña regeneradas. Aspectos como la inducción y elección del callo embriogénico y la concentración del agente de selección en condiciones de proliferación y regeneración, así como la composición de los medios para regeneración y enraizamiento, han sido ajustados para ambas metodologías (biobalística y *Agrobacterium*). Parámetros específicos como la cantidad adecuada de ADN y construcciones genéticas con el menor tamaño posible (biobalística), al igual que el co-cultivo en condiciones deshidratantes y las construcciones genéticas superbinarias con promotores de alta expresión constitutiva (*A. tumefaciens*), se encuentran en fase de evaluación para su futuro uso, dados los éxitos reportados en caña de azúcar por otros grupos de investigación con reconocida trayectoria (Anderson & Birch, 2012; Dong et al., 2014; Joyce et al., 2010; Kinkema et al., 2014; Taparia et al., 2012). Teniendo como base todos los ajustes mencionados, Cenicaña desarrolla proyectos de modificación genética dirigidos a la obtención de variedades con mayor contenido de sacarosa, mayor tonelaje de caña por hectárea, que muestren tolerancia al estrés por déficit hídrico y posean resistencia al complejo de especies de la plaga *Diatraea* spp. usando genes Cry. Los resultados logrados después de cuatro ciclos de selección utilizando variedades CC (Cenicaña Colombia) a las que se introdujeron diferentes genes asociados con dichas variables de producción, sembradas en diferentes ambientes (seco, semisecho, piedemonte y en condiciones de estrés hídrico por déficit) en campos confinados y bajo cubierta, muestran que algunas variedades transformadas podrían tener un impacto comercial por su mayor contenido de sacarosa, mayor TCH y tolerancia al estrés por déficit hídrico comparadas con las mismas variedades control no modi-

ficadas. Adicionalmente, algunas variedades que portan genes para tolerancia al estrés por déficit hídrico han mostrado un muy buen desempeño cuando se les ha suministrado solo el 50% de agua, contra el 100% que recibió el grupo control. Después de más de ocho años de investigación en laboratorio, invernadero de bioseguridad, bajo cubierta y campo confinado, a estas variedades modificadas se les hace seguimiento en varios ambientes para verificar la estabilidad de los transgenes, el número de copias, su expresión génica y se las compara con las variedades comerciales sin transgenes usadas como control. Se espera continuar la validación de los eventos obtenidos durante ciclos adicionales utilizando mayor área de siembra para cada variedad modificada, con el fin de corroborar su impacto comercial antes de que Cenicaña libere la primera caña modificada genéticamente con genes de segunda generación.

En 2019, Cenicaña inició un nuevo proyecto en esta área de investigación, para obtener variedades con resistencia al complejo de especies del barrenador de la caña *Diatraea* spp., compuesto por: *D. saccharalis*, *D. indigenella*, *D. tabernella* y *D. buskela*, que causan daño económico a la caña sembrada a lo largo del valle del río Cauca. La estrategia en paralelo utilizada consiste en: 1. identificar la eficacia de las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac usando bioensayos sobre las cuatro especies de *Diatraea* spp.; 2. Desarrollar una variedad de caña modificada con genes Cry1Ab/Cry1Ac para lograr una resistencia efectiva a las cuatro especies. Actualmente se tienen en invernadero de bioseguridad varios eventos de transformación de una variedad de caña transformada con el gen Cry1Ab que pasó las pruebas moleculares para validar la introgresión del transgen y la expresión de la proteína Cry1Ab. Adicionalmente, utilizando bioensayos, se determinó la eficacia de estas proteínas para conferir a la caña resistencia a las cuatro especies de la plaga, y se espera que pueda ser liberada comercialmente en el mediano plazo. En el futuro se proyecta desarrollar variedades de caña modificadas genéticamente con resistencia a otras plagas y que hagan un uso más eficiente del agua y del nitrógeno.

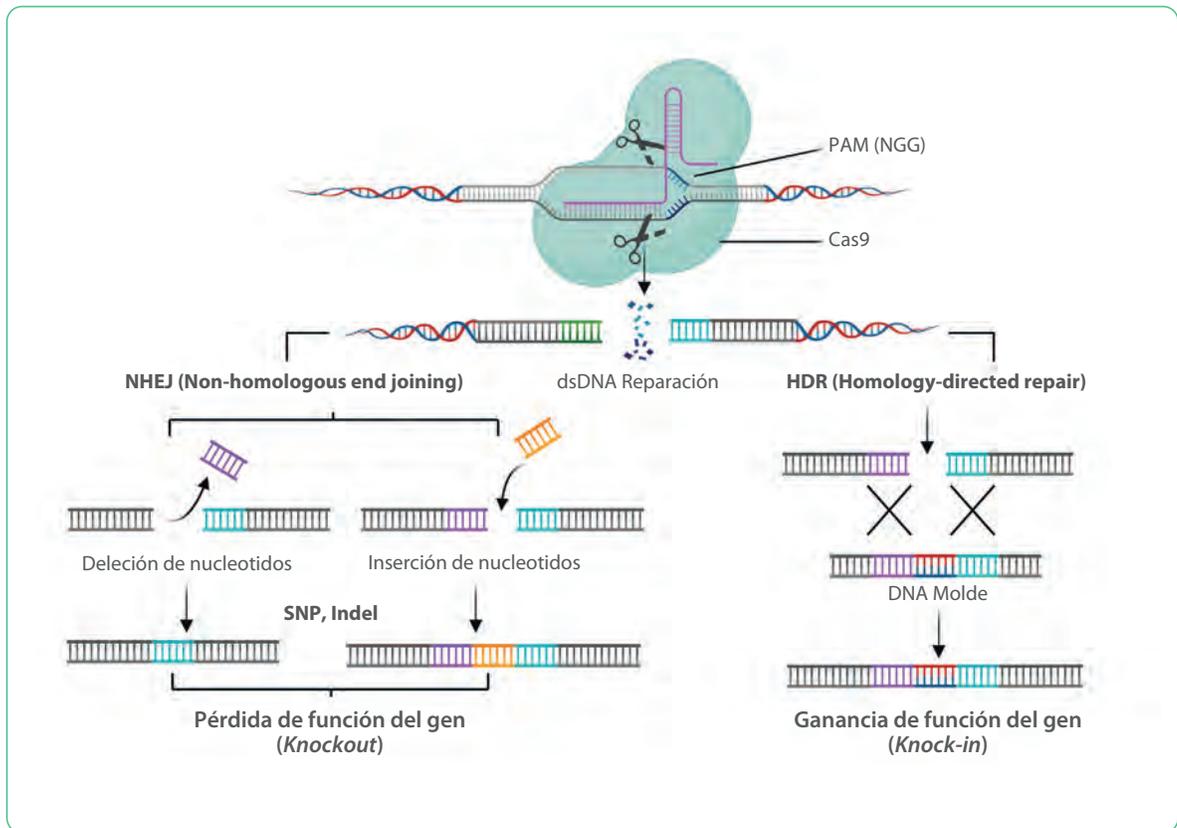
## Edición genética de la caña de azúcar

A pesar del notorio éxito del fitomejoramiento y la transgénesis para potenciar los indicadores de rendimiento y productividad del cultivo de caña de azúcar, persisten varias limitaciones en este propósito, relacionadas principalmente con la especificidad de las modificaciones genéticas y la incompatibilidad de las especies huésped (Songstad et al., 2017). Debido a esto, nuevas técnicas de mejoramiento de los cultivos están ganando atención mundial. Entre ellas ocupa lugar relevante la edición genética, que utiliza las nucleasas dirigidas al sitio (NDS), lo que supera las limitaciones asociadas con el mejoramiento clásico y la transgénesis. La edición genética es un tipo de ingeniería genética en la que una porción del ADN o un gen de un organismo es insertado, anulado o sustituido dentro de su propio genoma utilizando enzimas del tipo nucleasa, que se dirigen específicamente a una región compatible en el gen o genoma. Con frecuencia la reparación del sitio de inserción por los mecanismos celulares incorpora mutaciones en el sitio de corte. Esta tecnología, que se puede emplear, además, para modificar el gen deseado utilizando recombinación homóloga, así como para modificar también la regulación transcripcional y crear cambios estructurales dirigidos al sitio, promete ilimitadas aplicaciones en la ingeniería de plantas. En presencia de un ADN homólogo que sirva de molde, las roturas del ADN se reparan comúnmente por recombinación homóloga (HR). Por ello, si además de la endonucleasa se suministra un ARN molde que incorpore cambios específicos, estos cambios se integrarán en el punto de corte y se habrá podido introducir mutaciones bien definidas en sitios específicos del genoma. De la misma forma es posible introducir en el sitio de corte de la endonucleasa secuencias largas de ADN (por ejemplo, un transgén) si se añaden a ambos lados de la secuencia de

interés, secuencias homólogas al sitio de corte (Figura 3) (Podevin et al., 2013).

En la actualidad cuatro tipos de nucleasas se han empleado con éxito para la edición de genomas: meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas de efectores de tipo transcriptor (TALEN, por sus siglas en inglés) y más recientemente el sistema CRISPR-Cas [repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas (CRISPR) y Cas (asociadas a CRISPR)]. (Songstad et al., 2017). Este último sistema está conformado por dos mecanismos: una cadena de nucleótido llamada CRISPR, que codifica un ARN guía (ARNg) capaz de reconocer una región de ADN, y una proteína llamada CRISPR asociada (Cas), que funciona como una endonucleasa y utiliza ese ARN guía para cortar de una manera precisa el ADN en una región específica del genoma. Este nuevo método para editar genes es relativamente sencillo, económico y altamente preciso. El sistema CRISPR-Cas se percibe como una de las aplicaciones más revolucionarias del presente siglo, ya que desde su descubrimiento en 2012, cuando se demostró que este sistema inmunitario de las bacterias para defenderse del ataque de virus podría convertirse en una herramienta eficaz para la edición dirigida del material genético de cualquier ser vivo, sus posibilidades parecen no tener límites (Jinek et al., 2012). Nobel.

Usando la tecnología CRISPR-Cas es posible no solo adicionar genes sino también suprimirlos, ya sea por eliminación aleatoria o por inactivación por cambio de secuencia, o ambos. Por ejemplo, utilizando edición genética se puede eliminar el gen responsable de la susceptibilidad a una enfermedad y convertir una variedad suscep-



**Figura 3.** Distintos resultados del uso de nucleasas de sitio dirigido. Después del corte de doble cadena (double strand break, DSB) realizado por un complejo de SDN (en rojo), en ausencia de ADN que sirva de molde para la reparación, esta se realiza por “non-homologous end joining” (NHEJ) y se introducirán frecuentes cambios aleatorios en el sitio de corte (SDN1). Si la reparación se produce en presencia de un ADN molde, la reparación se hará por recombinación homóloga (RH). En el caso de que el ADN molde contenga cambios específicos en la secuencia, estos se obtendrán en el producto final (SDN2). Si el ADN molde está formado por una secuencia externa (ej. transgén) flanqueada por secuencias homólogas al sitio de inserción, el resultado de la reparación será la introducción de la secuencia externa en el sitio de corte (SDN3). (Podevin et al., 2013)

tible en un genotipo resistente si se introduce la secuencia correcta de dicho gen de resistencia. Wang et al. (2014) utilizaron el enfoque mediado por TALEN para eliminar los tres homólogos de locus resistente al moho (MLO), y emplearon la tecnología CRISPR para desarrollar plantas de trigo modificadas genéticamente que tienen mutaciones en el alelo TaMLO-A1. Las mutaciones de los tres MLO confirieron resistencia de amplio espectro al moho polvoriento. Usando el sistema

CRISPR se pueden editar también varios genes simultáneamente si se introduce una ruptura de doble cadena en varios sitios (Li et al., 2013). Es posible, igualmente, apilar múltiples genes utilizando el sistema CRISPR-Cas, lo que tiene una gran aplicación en la agricultura y en los nuevos enfoques de herramientas de mejoramiento molecular. A partir de 2013, la aplicación de la técnica basada en CRISPR/Cas9 en el ámbito de la edición genética de plantas (Li et al., 2013;

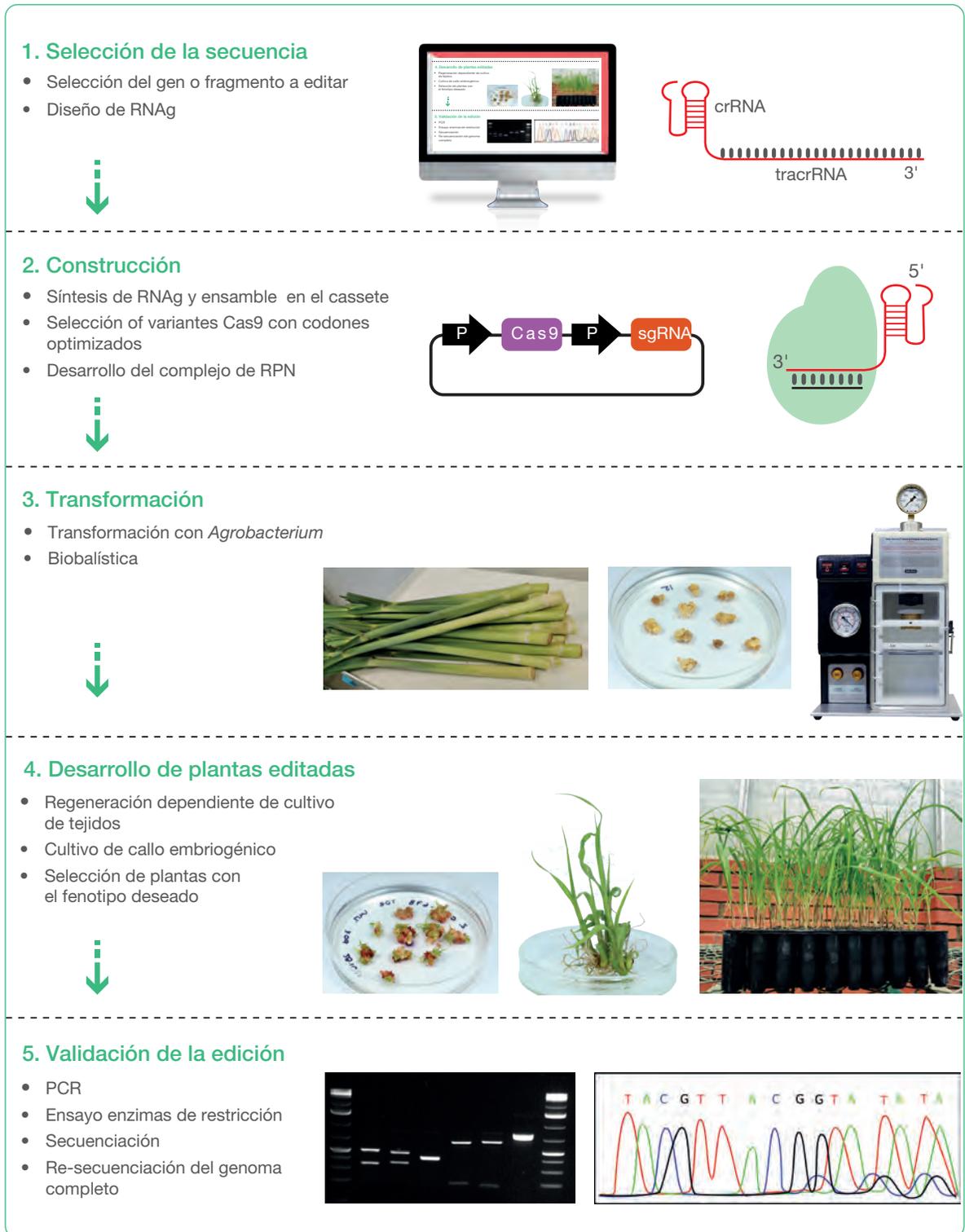
Shan et al., 2013) significó una disminución de sus costos, un aumento de su versatilidad, mayor simplicidad y un incremento de su capacidad para editar múltiples genes (Augustine, 2017), lo cual hace viable el desarrollo a corto plazo de metodologías rutinarias para la aplicación de la edición de genomas en agricultura basadas en técnicas de transferencia (ADN y complejo de ribonucleoproteínas (RNP)) bien conocidas, como la biobalística, *A. tumefaciens* y el tratamiento de protoplastos (Altpeter et al., 2016; Mohan, 2016). El sistema de edición del genoma CRISPR-Cas ya ha demostrado su eficiencia, versatilidad y simplicidad en numerosas aplicaciones en células humanas y animales, de microorganismos y plantas. Junto con la gran cantidad de bases de datos de genomas y transcriptomas disponibles, representa un enorme potencial para el fitomejoramiento y la investigación. Aunque la mayoría de los cambios producidos con CRISPR/Cas no difieren de las mutaciones que ocurren naturalmente, el uso de la transgénesis durante el desarrollo varietal todavía puede activar la legislación de organismos modificados genéticamente (OMG) en países que dependen de la regulación basada en procesos. Además, la integración estable del ADN que codifica las herramientas de edición del genoma en los genomas de las plantas puede producir mutagénesis de inserción, mientras que su expresión prolongada puede causar mutaciones en sitios fuera del objetivo. Estos obstáculos se pueden evitar con el suministro de complejos de ribonucleoproteínas (RNP), compuestos por la enzima recombinante purificada Cas9 y sgRNA sintetizado o transcrito *in vitro*.

La edición genética es un tipo de ingeniería genética en la que una porción del ADN o un gen de un organismo es insertado, anulado o sustituido dentro de su propio genoma utilizando enzimas del tipo nucleasa, que se dirigen específicamente a una región compatible en el gen o genoma.

## Edición genética de caña mediante Crispr-Cas

Introducir en una variedad élite comercial de caña de azúcar, cuyo genoma es complejo, un rasgo deseado a través del mejoramiento convencional es extremadamente laborioso y requiere de ~10 años para liberar una variedad mejorada. Además, la introgresión de múltiples rasgos gobernados por genes de herencia cuantitativa, sumada al silenciamiento de dichos genes, ha hecho casi imposible modificar genes asociados a variables de productividad. Sin embargo, con el advenimiento de la tecnología de modificación genética esta iniciativa podría lograrse en cierta medida. Ahora, con las técnicas de edición genética, es posible tener éxito en este propósito, lo que constituye uno de los mayores méritos del enfoque de la edición genética.

En la **Figura 4** se muestra el diagrama general del proceso de edición genética de la caña de azúcar empleando biobalística y complejo Ribonucleoproteína (RNP) + Cas9. En caña de azúcar la mayoría de los rasgos que sería deseable modificar para incrementar su producción (en TCH y contenido de sacarosa), así como su tolerancia al estrés hídrico son de carácter poligénico, es decir, varios genes interactúan entre sí para dar como resultado la característica deseada. Por ello, al editar solamente un gen de todo el complejo es poco probable que se logre la modificación del rasgo final. Sin embargo, esta técnica ha sido aplicada satisfactoriamente en otras especies de gramíneas, en las cuales se ha logrado la edición de varios genes simultáneamente al introducir varios ARN guías, por lo que no se descarta que nuevos avances en investigación permitan en el futuro utilizarla satisfactoriamente en otros cultivos con genomas más complejos, como es el caso de la caña de azúcar. En este cultivo, el aumento de los recursos de genómica funcional y nuevas herramientas bioinformáticas han permitido aplicar la edición genética utilizando la técnica TALEN para reducir el contenido total de lignina y así facilitar la producción de bioetanol lignocelulósico, siendo este el primer reporte de edición genética en caña de azúcar (Jung & Al-



**Figura 4.** Diagrama del proceso de edición genética en caña de azúcar que resalta sus etapas principales: 1. Selección del gen o secuencia a editar; 2. Construcción del vector; 3. Transformación; 4. Desarrollo de plantas editadas; 5. Validación de la edición.

tpeter, 2016). Posteriormente, durante el seguimiento en campo de las variedades editadas se corroboró la estabilidad del aumento de su contenido de azúcares totales –consecuencia de un menor contenido de lignina– sin disminuir la producción de biomasa (Kannan et al., 2018). Cabe resaltar que para el uso de esta herramienta de edición de genomas mediante CRISPR-Cas en el cultivo de la caña de azúcar se necesita conocer en detalle la secuencia de los genes y su asociación con las características que se pretende. Actualmente, con los resultados recientemente obtenidos a partir de la secuencia del genoma de la caña de azúcar, se espera identificar genes candidatos para su posterior uso en edición genética (Garsmeur et al., 2018; Zhang, et al., 2018).

En el largo plazo se espera que la edición genética en caña de azúcar se aplique para editar genes responsables --además de los rasgos ya mencionados-- de inducir su floración temprana. A mediano plazo y con la ayuda de la obtención de la secuencia completa del genoma de la variedad comercial CC 01-1940, que fue ensamblado por Cenicaña (Trujillo, 2020), se espera utilizar la edición del genoma de la caña, una vez identificados los genes responsables de los rasgos más relevantes implicados en su productividad, para

desarrollar variedades de caña que permitan aumentar el rendimiento comercial del cultivo.

Por último, es importante mencionar algunas de las regulaciones relacionadas con estas nuevas técnicas de mejoramiento genético, que incluyen la edición genética. Argentina, por la resolución ministerial 175/15 del 12 de mayo de 2015 y Brasil, mediante resolución normativa (RN) 16 de la CTNbio (Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad), aprobaron la producción de variedades y semillas mediante edición genética. Ello plantea la posibilidad de que las variedades producto de la edición genética sean clasificadas como sus contrapartes producto del mejoramiento convencional, y por ende no requieran de regulación, como sí sucede en caso de organismos vivos modificados. En Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), por Resolución 29299 del 1.º de agosto de 2018, determinó que si una variedad editada genéticamente no contiene trazas del ADN utilizado en la edición, sería considerada como una variedad obtenida por métodos convencionales; esto abrió un amplio campo de posibilidades para adelantar investigaciones con miras a desarrollar variedades mejoradas para su cultivo comercial, incluida la caña de azúcar.



A mediano plazo y con la obtención de la secuencia completa del genoma de la variedad comercial CC 01-1940, ensamblada por Cenicaña, se espera utilizar la edición del genoma de la caña, para desarrollar variedades de caña que permitan aumentar el rendimiento comercial del cultivo.



## Conclusiones y perspectivas futuras

Los actuales avances en la transformación genética mediada por biobalística ratifican su eficacia para la transferencia eficiente, con alta especificidad, del transgén e incluso de copia única, con un resultado equivalente a la transformación mediada por *Agrobacterium* (Wu et al., 2011). A pesar de que algunos promotores constitutivos se han utilizado con mayor frecuencia que los promotores inducibles, existe la necesidad de nuevos promotores que regulen con precisión la expresión del transgén. Se espera que una vez se disponga de la secuencia completa del genoma de la caña de azúcar será más factible para los investigadores validar la eficacia de los promotores, anotar su función y posteriormente ser utilizados en edición genética. Si bien a la fecha hay estrictas normas que regulan lo concerniente a los cultivos genéticamente modificados, incluida la caña de azúcar, es de prever que la escasez de alimentos, el impacto del cambio climático y la explosión demográfica conducirán a aprobarlos. Valga mencionar que esta aspiración cobró fuerza después de la campaña de los laureados al premio Nobel que apoya los cultivos genéticamente modificados (Richard, 2018). En cuanto a la caña de azúcar, varios países, entre ellos Brasil, que ya comercializa caña de azúcar modificada genéticamente (CTC20BT), al igual que Indonesia, Suráfrica, Argentina y Colombia adelantan proyectos de investigación para obtener caña genéticamente mejorada por transformación y edición genética. Si bien los obstáculos que hay que vencer son aún muchos –entre ellos la inactivación transgénica, la falta de un genoma completamente secuenciado y



anotado, al igual que la falta de un protocolo eficiente de transformación genética y otro de edición genética libre de ADN-, usando el complejo de RNP es de suponer que, al igual que tantos otros ya rebasados, se superarán en el futuro. Porque es indudable que la ingeniería genética combinada con novedosas estrategias de mejoramiento serán fundamentales para que la agroindustria de la caña de azúcar se sustente en una bioeconomía más fuerte, sostenible y amigable con el ambiente. El sistema de edición genética libre de ADN basado en CRISPR / Cas y RNP, de seguro se convertirá en la mejor estrategia para desarrollar nuevas variedades en muchos cultivos. En lo que respecta a la caña de azúcar, se espera que, cuando se disponga de la secuencia del genoma completo, habrá notables avances en la genómica para desarrollar nuevas variedades con mejoras en los indicadores de producción. Además, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas avanzadas que ayuden en el diseño de caracteres específicos de RNAg y técnicas de detección de alto rendimiento para identificar mutantes, indudablemente abre nuevos horizontes a la plataforma de edición genética a nuevos horizontes para desarrollar nuevas variedades en diferentes cultivos, entre ellos la caña de azúcar, que beneficiarán a la población humana. Una política reguladora apropiada que distinga entre organismos genéticamente modificados y organismos desarrollados a partir de edición genética permitirá explotar estas técnicas de manera más eficiente.

## Referencias bibliográficas

- Altpeter, F.; & Oraby, H. (2010). Sugarcane. In: F. Kempken & C. Jung (Eds.). Genetic Modification of Plants, Biotechnology in Agriculture and Forestry, 64 (pp. 453–472). Berlin: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02391-0>
- Altpeter, F.; Springer, N. M.; Bartley, L. E.; Blechl, A. E.; Brutnell, T. P.; Citovsky, V.; Conrad, L. J.; Gelvin, S. B.; Jackson, D. P.; Kausch, A. P.; Lemaux, P. G.; Medford, J. I.; Orozco-Cárdenas, M. L.; Tricoli, D. M.; Van Eck, J.; Voytas, D. F.; Walbot, V.; Wang, K.; Zhang, Z. J. & Stewart, C. N., Jr (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant cell*, 28(7), pp. 1510-1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
- Anderson, D. J.; Gnanasambandam, A.; Mills, E.; O’Shea, M. G.; Nielsen, L. K. & Brumbley, S. M. (2011). Synthesis of Short-Chain-Length/Medium-Chain Length Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolymers in Peroxisomes of Transgenic Sugarcane Plants. *Tropical Plant Biology* 4, pp. 170-184. <https://doi.org/10.1007/s12042-011-9080-7>
- Anderson, D. J. & Birch, R. G. (2012). Minimal Handling and Super-Binary Vectors Facilitate Efficient, Agrobacterium-Mediated, Transformation of Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Tropical Plant Biology*, 5(2), pp. 183-192 <https://doi.org/10.1007/s12042-012-9101-1>
- Arencibia, A. D.; Molina, P.; Gutiérrez, C.; Fuentes, A.; Greenidge, V.; Menéndez, E.; Selmán-Housein, G. (1992). Regeneration of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants from intact meristematic tissue transformed by electroporation. *Biotecnología aplicada*, 9, pp. 156-165.
- Arencibia, A.; Molina, P. R.; de la Riva, G. & Selmán-Housein, G. (1995). Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant cell reports*, 14(5), pp. 305-309. <https://doi.org/10.1007/BF00232033>
- Arencibia, A.; Vázquez, R. I.; Prieto, D.; Téllez, P.; Carmona, E. R.; Coego, A.; Hernández, L.; De la Riva, G. & Selmán-Housein, G. (1997). Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding*, 3(4), pp. 247-255. <https://doi.org/10.1023/A:1009616318854>
- Arencibia, A. D.; Carmona, E. R.; Téllez, P.; Chan, M. T.; Yu, S. M.; Trujillo, L. E. & Oramas, P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*, 7(3), pp. 213-222. <https://doi.org/10.1023/A:1008845114531>

- Arencibia, A. D.; Carmona, E. R.; Cornide, M. T.; Castiglione, S.; O'Reilly, J.; China, A.; Oramas, P. & Sala, F. (1999). Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. *Transgenic Research*, 8, pp. 349-360. <https://doi.org/10.1023/A:1008900230144>
- Arvinth, S.; Arun, S.; Selvakesavan, R. K.; Srikanth, J.; Mukunthan, N.; Ananda Kumar, P.; Premachandran, M. N. & Subramonian, N. (2010). Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. *Plant cell reports* 29(4), pp. 383-395. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0829-5>
- Aslam, U.; Tabassum, B.; Nasir, I. A.; Khan, A. & Husnain, T. (2018). A virus-derived short hairpin RNA confers resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. *Transgenic research*, 27(2), pp. 203-210. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0066-1>
- Augustine, S. M.; Narayan, J. A.; Syamaladevi, D. P.; Appunu, C.; Chakravarthi, M.; Ravichandran, V. & Subramonian, N. (2015). *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 232, pp. 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.012>
- Augustine, S. M. (2017). CRISPR-Cas9 System as a Genome Editing Tool in Sugarcane. In C. Mohan (Ed.), *Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects* (pp. 155-172). Sao Carlos, Brasil: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-58946-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-58946-6_11)
- Avellaneda, M.C.; Victoria, J. I. (2008). Avances en la resistencia transgénica de la variedad CC 85-92 a escaldadura de la hoja (LSD) y raquitismo de la soca (RSD). Cenicafé. Informe final. Cali.
- Barba, R. & Nickell, L. G. (1969). Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. *Planta*, 89(3), pp. 299-302. <https://doi.org/10.1007/BF00385034>
- Barros, G. O.; Ballen, M. A.; Woodard, S. L.; Wilken, L. R.; White, S. G.; Damaj, M. B.; Mirkov, T. E. & Nikolov, Z. L. (2013). Recovery of bovine lysozyme from transgenic sugarcane stalks: extraction, membrane filtration, and purification. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(10), 1407-1416. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0878-y>
- Basnayake, S. W.; Morgan, T. C.; Wu, L. & Birch, R. G. (2012). Field performance of transgenic sugarcane expressing isomaltulose synthase. *Plant biotechnology journal*, 10(2), 217-225. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00655.x>

- Bonilla, M. L. (2007). Embriogénesis somática y expresión transitoria del gen GUS como fase previa en el desarrollo de una metodología de transformación genética en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Colombia.
- Bonilla, M. L.; Muñoz, J. E.; Ángel, F. (2008). Expresión transitoria del gen GUS en caña de azúcar usando *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Agronómica*, 57 (3), 161-166.
- Beyene, G.; Curtis, I. S.; Damaj, M. B.; Buenrostro-Nava, M. T. & Erik, M. T. (2013). Genetic Engineering of *Saccharum*. In: H. A. Paterson (Ed.), *Genomics of the Saccharinae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. New York.
- Molinari, HBC.; Marur, CJ.; Daros, E.; Campos, MKF.; Carvalho, JF.; Bessalho, JC.; Pereira, LFP.; Vieira, LGE (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol Plant* 130(2): pp. 218-229. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00909.x>
- Cristofolletti, P. T.; Kemper, E. L.; Capella, A. N.; Carmago, S. R.; Cazoto, J. L.; Ferrari, F.; Galvan, T. L.; Gauer, L.; Monge, G.A.; Nishikawa, M.A.; Santos, M.; Semeao, A. A.; Silva, L.; Willse, A. R.; Zanca, A. & Edgerton, M. D. (2018). Development of Transgenic Sugarcane Resistant to Sugarcane Borer. *Tropical Plant Biology*, pp. 1-14. <https://doi.org/10.1007/s12042-018-9198-y>
- Dermawan, H.; Karan, R.; Jung, J. H.; Zhao, Y.; Parajuli, S.; Sanahuja, G. & Altpeter, F. (2016). Development of an intragenic gene transfer and selection protocol for sugarcane resulting in resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(3), pp. 459-468. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1014-5>
- Dong, S.; Delucca, P.; Geijskes, R. J.; Ke, J.; Mayo, K.; Mai, P.; Sainz, M.; Caffall, K.; Moser, T.; Yarnall, M.; Setliff, K.; Jain, R.; Rawls, E.; Smith-Jones, M. & Dunder, E. (2014). Advances in *Agrobacterium*-Mediated Sugarcane Transformation and Stable Transgene Expression. *Sugar Tech*. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0294-x>
- Elliott, A. R.; Campbell, J. A.; Dugdale, B.; Brettell, R. I. S. & Grof, C. P. L. (1999). Green-fluorescent protein facilitates rapid in vivo detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Reports*, 18, pp. 707-714. <https://doi.org/10.1007/s002990050647>
- Enríquez-Obregón, G. A.; Vázquez-Padrón, R.; Prieto-Samsónov, D. L.; De la Riva, G. & Selmán-Housein, G. (1998). Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta*, 206, pp. 20-27. <https://doi.org/10.1007/s004250050369>.
- Falco, M. C.; Tulmann Neto, A. & Ulian, E. C. (2000). Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. *Plant cell reports*, 19(12), pp. 1188-1194. <https://doi.org/10.1007/s002990000253>

- Ferreira, S. J.; Kossmann, J.; Lloyd, J. R. & Groenewald, J. H. (2008). The reduction of starch accumulation in transgenic sugarcane cell suspension culture lines. *Biotechnology journal*, 3(11), pp. 1398-1406. <https://doi.org/10.1002/biot.200800106>
- Gallo-Meagher, M. & Irvine, J. E. (1996). Herbicide Resistant Transgenic Sugarcane Plants Containing the bar Gene. *Crop Science*, 36(5), 1367. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600050047x>
- Gambley, R. L.; Ford, R. & Smith, G. R. (1993). Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing  $\beta$ -Glucuronidase. *Plant cell reports*, 12(6), pp. 343-346. <https://doi.org/10.1007/BF00237432>
- Gao, S.; Yang, Y.; Wang, C.; Guo, J.; Zhou, D.; Wu, Q.; Su, Y.; Xu, L. & Que, Y. (2016). Transgenic Sugarcane with a cry1Ac Gene Exhibited Better Phenotypic Traits and Enhanced Resistance against Sugarcane Borer. *PLoS one*, 11(4), e0153929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153929>
- Garsmeur, O.; Droc, G.; Antonise, R.; Grimwood, J.; Potier, B.; Aitken, K.; Jenkins, J.; Martin, G.; Charron, C.; Hervouet, C.; Costet, L.; Yahiaoui, N.; Healey, A.; Sims, D.; Cherukuri, Y.; Sreedasyam, A.; Kilian, A.; Chan, A.; Van Sluys, M. A.; Swaminathan, K.; D'Hont, A. (2018). A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. *Nature communications*, 9(1), 2638. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05051-5>
- Gilbert, R. A.; Gallo-Meagher, M.; Comstock, J. C.; Miller, J. D.; Jain, M. & Abouzid, A. (2005). Agronomic Evaluation of Sugarcane Lines Transformed for Resistance to Sugarcane mosaic virus Strain E, 45, pp. 2060-2067. Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/45/5/2060>
- Gilbert, R. A.; Glynn, N. C.; Comstock, J. C. & Davis, M. J. (2009). Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. *Field Crops Research*, 111(1-2), pp. 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.10.009>
- Groenewald, J. H. & Botha, F. C. (2008). Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. *Transgenic research*, 17(1), pp. 85-92. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9079-x>
- Guerzoni, J. T. S.; Belintani, N. G.; Moreira, R. M. P.; Hoshino, A. A.; Domingues, D. S.; Filho, J. C. B. & Vieira, L. G. E. (2014). Stress-induced  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(9), pp. 2309-2319. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1579-8>
- Hall, R. M.; Geijskes, R. J.; Harrison, M. D.; Jepson, I.; Kinkema, M.; Miles, S.; Dale, J. L. (2013). Improved Expression of Cellulolytic Enzymes in Sugarcane. In: *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol*, vol. 28, pp. 1-12.

- Hamerli, D. & Birch, R. G. (2011). Transgenic expression of trehalulose synthase results in high concentrations of the sucrose isomer trehalulose in mature stems of field-grown sugarcane. *Plant biotechnology journal*, 9(1), pp. 32-37. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00528.x>
- Harrison, M. D.; Geijskes, J.; Coleman, H. D.; Shand, K.; Kinkema, M.; Palupe, A.; Hassall, R.; Sainz, M.; Lloyd, R.; Miles, S. & Dale, J. L. (2011). Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane. *Plant biotechnology journal*, 9(8), pp. 884-896. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00597.x>
- Heinz, D. J. & Mee, G. W. P. (1969). Plant Differentiation from Callus Tissue of *Saccharum* Species. *Crop Science*, 9(3), 346 pp. <https://doi.org/10.2135/cropsci1969.0011183X000900030030x>
- Ingelbrecht, I. L.; Irvine, J. E. & Mirkov, T. E. (1999). Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection Of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant physiology*, 119(4), pp. 1187-1198. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1187>
- ISAAA. (2013). Indonesia Approves First GM Sugarcane- Crop Biotech Update ( 5/22/2013 ) | ISAAA.org/KC. Retrieved April 10, 2018, from <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=10989>
- ISAAA. (2017). Brazil Approves GM Sugarcane for Commercial Use- Crop Biotech Update (6/14/2017 ) | ISAAA.org/KC. Retrieved April 10, 2018, from <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=15510>
- Jackson, M. A.; Nutt, K. A.; Hassall, R. & Rae, A. L. (2010). Comparative efficiency of sub-cellular targeting signals for expression of a toxic protein in sugarcane. *Functional Plant Biology*, 37(8), pp. 785-793. <https://doi.org/10.1071/FP09243>
- Jain, M.; Chengalrayan, K.; Abouzid, A. & Gallo, M. (2007). Prospecting the utility of a PMI/ mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants. *Plant cell reports*, 26(5), pp. 581-590. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0244-0>
- Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (New York, N.Y.), 337(6096), pp. 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Joyce, P.A.; McQualter, R.B.; Bernard, M.J. and Smith, G.R. (1998). Engineering for resistance to SCMV in sugarcane. *Acta Hort.* 461, pp. 385-392. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.461.44>

- Joyce, P.; Kuwahata, M.; Turner, N. & Lakshmanan, P. (2010). Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. *Plant cell reports*, 29(2), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0810-3>
- Joyce, P.; Hermann, S.; O'Connell, A.; Dinh, Q.; Shumbe, L. & Lakshmanan, P. (2014). Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. *Plant biotechnology journal*, 12(4), pp. 411-424. <https://doi.org/10.1111/pbi.12148>
- Jung, J. H.; Fouad, W. M.; Vermerris, W.; Gallo, M. & Altpeter, F. (2012). RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. *Plant biotechnology journal*, 10(9), pp. 1067-1076. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00734.x>
- Jung, J. H.; Vermerris, W.; Gallo, M.; Fedenko, J. R.; Erickson, J. E. & Altpeter, F. (2013). RNA interference suppression of lignin biosynthesis increases fermentable sugar yields for biofuel production from field-grown sugarcane. *Plant biotechnology journal*, 11(6), pp. 709-716. <https://doi.org/10.1111/pbi.12061>
- Jung, J. H.; & Altpeter, F. (2016). TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant molecular biology*, 92 (1-2), pp. 131-142. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0499-y>
- Jung, J. H.; Kannan, B.; Dermawan, H.; Moxley, G. W. & Altpeter, F. (2016). Precision breeding for RNAi suppression of a major 4-coumarate:coenzyme A ligase gene improves cell wall saccharification from field grown sugarcane. *Plant molecular biology*, 92 (4-5), pp. 505-517. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0527-y>
- Kannan, B.; Jung, J. H.; Moxley, G. W.; Lee, S. M. & Altpeter, F. (2018). TALEN-mediated targeted mutagenesis of more than 100 COMT copies/alleles in highly polyploid sugarcane improves saccharification efficiency without compromising biomass yield. *Plant biotechnology journal*, 16 (4), pp. 856-866. <https://doi.org/10.1111/pbi.12833>
- Kim, J. Y.; Nong, G.; Rice, J. D.; Gallo, M.; Preston, J. F. & Altpeter, F. (2017). In planta production and characterization of a hyperthermostable GH10 xylanase in transgenic sugarcane. *Plant molecular biology*, 93 (4-5), pp. 465-478. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0573-5>
- Kinkema, M.; Geijskes, J.; Delucca, P.; Palupe, A.; Shand, K.; Coleman, H. D.; Brinin, A.; Williams, B.; Sainz, M. & Dale, J. L. (2014). Improved molecular tools for sugar cane biotechnology. *Plant molecular biology*, 84 (4-5), pp. 497-508. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0147-8>
- Lakshmanan, P.; Geijskes, R. J.; Karen, A.; Grof, C. L. P.; Bonnett, G. D. & Smith, G. R. (2005). Invited review: sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41, pp. 345-363.

- Li, J. F.; Norville, J. E.; Aach, J.; McCormack, M.; Zhang, D.; Bush, J.; Church, G. M. & Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31 (8), pp. 688-691. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>
- Li, J.; Phan, T. T.; Li, Y. R.; Xing, Y. X. & Yang, L. T. (2018). Solation, transformation and overexpression of sugarcane SoP5CS gene for drought tolerance improvement. *Sugar Tech*, 20 (4), pp. 464-473. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0568-9>
- Ma, H.; Albert, H. H.; Paull, R. & Moore, P. H. (2000). Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. *Functional Plant Biology*, 27 (11), pp. 1021-1030. Retrieved from <https://doi.org/10.1071/PP00029>
- Manickavasagam, M.; Ganapathi, A.; Anbazhagan, V. R.; Sudhakar, B.; Selvaraj, N.; Vasudevan, A.; & Kasthuriengan, S. (2004). Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant cell reports*, 23 (3), pp. 134-143. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0794-y>
- Mayavan, S.; Subramanyam, K.; Arun, M.; Rajesh, M.; Kapil Dev, G.; Sivanandhan, G.; Jaganath, B.; Manickavasagam, M.; Selvaraj, N. & Ganapathi, A. (2013). Agrobacterium tumefaciens-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. *Plant cell reports*, 32 (10), pp. 1557-1574. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1467-5>
- Mayavan, S.; Subramanyam, K.; Jaganath, B.; Sathish, D.; Manickavasagam, M. & Ganapathi, A. (2015). Agrobacterium-mediated in planta genetic transformation of sugarcane setts. *Plant cell reports*, 34 (10), pp. 1835-1848. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1831-8>
- McQualter, R. B.; Dale, J. L.; Harding, R. M.; McMahon, J. A. & Smith, G. R. (2004). Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55 (2), pp. 139-145. <https://doi.org/10.1071/AR03131>
- McQualter, R. B.; Chong, B. F.; Meyer, K.; Van Dyk, D. E.; O'Shea, M. G.; Walton, N. J.; Vitonen, P. V. & Brumbley, S. M. (2005). Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. *Plant biotechnology journal*, 3 (1), pp. 29-41. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00095.x>
- McQualter, R. B. & Dookun-Sauntally, A. (2007). Expression profiling of abiotic-stress-inducible genes in sugarcane. In: *Proc Int Soc Sugar Cane Technol*, vol. 26, pp. 878-888).
- Mohan C. (2016). Genome Editing in Sugarcane: Challenges Ahead. *Frontiers in plant science*, 7, 1542 pp. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01542>

- Moore, P. H.; Paterson, A. H. & Tew, T. (2013). Sugarcane: The Crop, the Plant, and Domestication. In: Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology (pp. 1-17). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118771280.ch1>
- Mosquera, P. A. (2011). Expresión transitoria del gen Gus Plus(R) en callo embriogénico de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) mediante bombardeo de microparticulas utilizando el dispositivo Hepta-Cenicaña. Tesis de Pregrado. Universidad del Valle, Cali. Colombia.
- Mudge, S. R.; Basnayake, S. W.; Moyle, R. L.; Osabe, K.; Graham, M. W.; Morgan, T. E. & Birch, R. G. (2013). Mature-stem expression of a silencing-resistant sucrose isomerase gene drives isomaltulose accumulation to high levels in sugarcane. *Plant biotechnology journal*, 11 (4), pp. 502-509. <https://doi.org/10.1111/pbi.12038>
- Nayyar, S.; Sharma, B. K.; Kaur, A.; Kalia, A.; Sanghera, G. S.; Thind, K. S.; Yadav, I. S. & Sandhu, J. S. (2017). Red rot resistant transgenic sugarcane developed through expression of  $\alpha$ -1,3-glucanase gene. *PloS one*, 12 (6), e0179723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179723>
- Petrasovits, L. A.; McQualter, R. B.; Gebbie, L. K.; Blackman, D. M.; Nielsen, L. K. & Brumbley, S. M. (2013). Chemical inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase as a strategy to increase polyhydroxybutyrate yields in transgenic sugarcane. *Plant biotechnology journal*, 11 (9), pp. 1146-1151. <https://doi.org/10.1111/pbi.12109>
- Podevin, N.; Davies, H. V.; Hartung, F.; Nogué, F. & Casacuberta, J. M. (2013). Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in biotechnology*, 31 (6), 375-383. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.004>
- Ramasamy, M.; Mora, V.; Damaj, M. B.; Padilla, C. S.; Ramos, N.; Rossi, D.; Solís-Gracia, N.; Vargas-Bautista, C.; Irigoyen, S.; DaSilva, J. A.; Mirkov, T. E. & Mandadi, K. K. (2018). A biolistic-based genetic transformation system applicable to a broad-range of sugarcane and energycane varieties. *GM crops & food*, 9 (4), pp. 211-227. <https://doi.org/10.1080/21645698.2018.1553836>
- Rangel, M. P.; Tabares Z., E.; Lentini, Z.; Tohme M., J.; Mirkov, E.; Victoria Kafure, J. I. & Angel, F. (2002). Transformación de plantas de caña de azúcar susceptibles al síndrome de la hoja amarilla = Transformation of sugar cane plants susceptible to yellow leaf virus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4 (1), 54-60.
- Rangel, M. P.; Gómez, L.; Victoria, J. I. & Angel, F. (2005). Transgenic plants of CC 84-75 resistant to the virus associated with the sugarcane yellow leaf disease. In: *Proc. ISSCT*, vol. 25, pp. 564-570). Ciudad de Guatemala.
- Rathus, C. & Birch, R. G. (1992). Stable transformation of callus from electroporated sugarcane protoplasts. *Plant Science*, 82 (1), pp. 81-89. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90010-J](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90010-J)

- Reis, R. R.; da Cunha, B. A.; Martins, P. K.; Martins, M. T.; Alekcevetch, J. C.; Chalfun, A., Jr; Andrade, A. C.; Ribeiro, A. P.; Qin, F.; Mizoi, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Nakashima, K.; Carvalho, J.; de Sousa, C. A.; Nepomuceno, A. L.; Kobayashi, A. K. & Molinari, H. B. (2014). Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 221-222, pp. 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.003>
- Ribeiro, C. W.; Soares-Costa, A.; Falco, M. C.; Chabregas, S. M.; Ulian, E. C.; Cotrin, S. S.; Carmona, A. K.; Santana, L. A.; Oliva, M. L. & Henrique-Silva, F. (2008). Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. *Bio-technology progress*, 24 (5), pp. 1060-1066. <https://doi.org/10.1002/btpr.45>
- Roberts, R.J. (2018). The Nobel Laureates Campaign Supporting GMO. *Journal of Innovation & Knowledge*, Volume 3, Issue 2, pp. 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.jik.2017.12.006>
- Rossouw, D.; Bosch, S.; Kossmann, J.; Botha, F. C. & Groenewald, J. H. (2007). Downregulation of neutral invertase activity in sugarcane cell suspension cultures leads to a reduction in respiration and growth and an increase in sucrose accumulation. *Functional plant Biology: FPB*, 34 (6), pp. 490-498. <https://doi.org/10.1071/FP06214>
- Rossouw, D.; Kossmann, J.; Botha, F. C. & Groenewald, J. H. (2010). Reduced neutral invertase activity in the culm tissues of transgenic sugarcane plants results in a decrease in respiration and sucrose cycling and an increase in the sucrose to hexose ratio. *Functional Plant Biology*, 37 (1), 22-31. <https://doi.org/10.1071/FP08210>
- Sanford, J. C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79 (1), 206-209. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x>
- Schneider, V. K.; Soares-Costa, A.; Chakravarthi, M.; Ribeiro, C.; Chabregas, S. M.; Falco, M. C. & Henrique-Silva, F. (2017). Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *Plant cell reports*, 36 (1), pp. 193-201. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2071-2>
- Shan, Q.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, Y.; Chen, K.; Liang, Z.; Zhang, K.; Liu, J.; Xi, J. J.; Qiu, J. L. & Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31 (8), pp. 686-688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
- Shu-Zhen, Z.; Ben-Peng, Y.; Cui-Lian, F.; Ru-Kai, C.; Jing-Ping, L.; Wen-Wei, C. & Fei-Hu, L. (2006). Expression of the *Grifola frondosa* Trehalose Synthase Gene and Improvement of Drought-Tolerance in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (4), pp. 453-459. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00246.x>
- Snyman S.J. (2004). Sugarcane Transformation. In: Curtis I.S. (eds). *Transgenic Crops of the World*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2333-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2333-0_8)

- Snyman, S. J.; Meyer, G. M.; Richards, J. M.; Haricharan, N.; Ramgareeb, S. & Hockett, B. I. (2006). Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: Effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant cell reports*, 25 (10), 1016-1023. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0148-z>
- Snyman, S. J.; Hajari, E.; Watt, M. P.; Lu, Y. & Kridl, J. C. (2015). Improved nitrogen use efficiency in transgenic sugarcane: phenotypic assessment in a pot trial under low nitrogen conditions. *Plant cell reports*, 34 (5), pp. 667-669. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1768-y>
- Songstad, D. D.; Petolino, J. F.; Voytas, D. F. & Reichert, N. A. (2017). Genome Editing of Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36 (1), pp. 1-23. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1281663>
- Taparia, Y.; Fouad, W. M.; Gallo, M. & Altpeter, F. (2012). Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48 (1), pp. 15-22. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9389-9>
- Taparia, Y.; Gallo, M. & Altpeter, F. (2012). Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111, pp. 131-141. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0177-y>
- Trujillo, JH. (2020). Ensamblaje de un genoma y huella molecular de caña de azúcar utilizando secuenciación de alto rendimiento. Tesis Doctoral. Universidad del Valle y Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia, Genicaña. Cali, Colombia.
- van Beek, C. R.; Fernhout, J. J.; Kossmann, J.; Lloyd, J. R. & van der Vyver, C. (2018). Use of a Mutated Protoporphyrinogen Oxidase Gene as an Effective In Vitro Selectable Marker System that Also Conveys in planta Herbicide Resistance in Sugarcane. *Tropical Plant Biology*, 11 (3-4), 154-162. <https://doi.org/10.1007/s12042-018-9208-0>
- Vickers, J. E.; Grof, C. P. L.; Bonnett, G. D.; Jackson, P. A. & Morgan, T. E. (2005). Effects of tissue culture, biolistic transformation, and introduction of PPO and SPS gene constructs on performance of sugarcane clones in the field. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56 (1), pp. 57-68. <https://doi.org/10.1071/AR04159>
- Vickers, J. E.; Grof, C. P. L.; Bonnett, G. D.; Jackson, P. A.; Knight, D. P.; Roberts, S. E. & Robinson, S. P. (2005). Overexpression of Polyphenol Oxidase in Transgenic Sugarcane Results in Darker Juice and Raw Sugar. *Crop Science*, 45 (1), pp. 354-362. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0354>
- van der Vyver, C. (2010). Genetic transformation of the euploid *Saccharum officinarum* via direct and indirect embryogenesis. *Sugar Tech*, 12 (1), pp. 21-25. <https://doi.org/10.1007/s12355-010-0005-9>

- van der Vyver, C.; Conradie, T.; Kossmann, J. & Lloyd, J. (2013). *In vitro* selection of transgenic sugarcane callus utilizing a plant gene encoding a mutant form of acetolactate synthase. *In vitro cellular & developmental biology. Plant: journal of the Tissue Culture Association*, 49 (2), pp. 198-206. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9493-0>
- Wang, M. L.; Goldstein, C.; Su, W.; Moore, P. H. & Albert, H. H. (2005). Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. *Transgenic research*, 14 (2), pp. 167-178. <https://doi.org/10.1007/s11248-004-5415-6>
- Wang, Z. Z.; Zhang, S. Z.; Yang, B. P. & Li, Y. R. (2005). Trehalose synthase gene transfer mediated by *Agrobacterium tumefaciens* enhances resistance to osmotic stress in sugarcane. *Sugar Tech*, 7 (1), pp. 49-54. <https://doi.org/10.1007/BF02942417>
- Wang, A. Q.; Dong, W. Q.; Wei, Y. W.; Huang, C. M.; He, L. F.; Yang, L. T. & Li, Y. R. (2009). Transformation of sugarcane with ACC oxidase antisense gene. *Sugar Tech*, 11 (1), pp. 39-43. <https://doi.org/10.1007/s12355-009-0007-7>
- Wang, Y.; Cheng, X.; Shan, Q.; Zhang, Y.; Liu, J.; Gao, C. & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32 (9), pp. 947-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
- Wang, W. Z.; Yang, B. P.; Feng, C. L.; Wang, J. G.; Xiong, G. R.; Zhao, T. T. & Zhang, S. Z. (2017). Efficient Sugarcane Transformation via bar Gene Selection. *Tropical Plant Biology*, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12042-017-9186-7>
- Weng, L. X.; Deng, H.; Xu, J. L.; Li, Q.; Wang, L. H.; Jiang, Z.; Zhang, H. B.; Li, Q. & Zhang, L. H. (2006). Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. *Pest management science*, 62 (2), pp. 178-187. <https://doi.org/10.1002/ps.1144>
- Weng, L. X.; Deng, H. H.; Xu, J. L.; Li, Q.; Zhang, Y. Q.; Jiang, Z. D.; Li, Q. W.; Chen, J. W. & Zhang, L. H. (2011). Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified cry1Ac provide effective control against stem borers in field trials. *Transgenic research*, 20 (4), pp. 759-772. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9456-8>
- Wu, H.; Awan, F. S.; Vilarinho, A.; Zeng, Q.; Kannan, B.; Phipps, T.; McCuiston, J.; Wanf, W.; Caffall, K. & Altpeter, F. (2011). Transgene integration complexity and expression stability following biolistic or *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* (November). <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9710-0>
- Wu, L. & Birch, R. G. (2007). Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant biotechnology journal*, 5 (1), pp. 109-117. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00224.x>

- Wu, Y.; Zhou, H.; Que, Y. X.; Chen, R. K. & Zhang, M. Q. (2008). Cloning and identification of promoter Prd29A and its application in sugarcane drought resistance. *Sugar Tech*, 10 (1), pp. 36-41. <https://doi.org/10.1007/s12355-008-0006-0>
- Yao, W.; Ruan, M.; Qin, L.; Yang, C.; Chen, R.; Chen, B. & Zhang, M. (2017). Field Performance of Transgenic Sugarcane Lines Resistant to Sugarcane Mosaic Virus. *Frontiers in plant science*, 8, pp. 104. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00104>
- Zale, J.; Jung, J. H.; Kim, J. Y.; Pathak, B. Karan, R.; Liu, H.; Chen, X.; Wu, H.; Candreva, J.; Zhai, Z.; Shanklin, J. & Altpeter, F. (2016). Metabolic engineering of sugarcane to accumulate energy-dense triacylglycerols in vegetative biomass. *Plant biotechnology journal*, 14 (2), pp. 661-669. <https://doi.org/10.1111/pbi.12411>
- Zhang, J.; Zhang, X.; Tang, H.; Zhang, Q.; Hua, X.; Ma, X.; Zhu, F.; Jones, T.; Zhu, X.; Bowers, J.; Wai, C. M.; Zheng, C.; Shi, Y.; Chen, S.; Xu, X.; Yue, J.; Nelson, D. R.; Huang, L.; Li, Z.; Xu, H.; Ming, R. (2018). Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nature genetics*, 50 (11), pp. 1565-1573. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0237-2>
- Zhang, L.; Xu, J. & Birch, R. G. (1999). Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nature biotechnology*, 17 (10), pp. 1021-1024. <https://doi.org/10.1038/13721>
- Zhang, M.; Zhuo, X.; Wang, J.; Wu, Y.; Yao, W. & Chen, R. (2015). Effective selection and regeneration of transgenic sugarcane plants using positive selection system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51, pp. 52-61. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9644-y>
- Zhang, M.; Zhuo, X.; Wang, J.; Yang, C.; Powell, C. A. & Chen, R. (2015). Phosphomannose isomerase affects the key enzymes of glycolysis and sucrose metabolism in transgenic sugarcane overexpressing the *manA* gene. *Molecular breeding: new strategies in plant improvement*, 35(3), p. 100. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0295-4>
- Zhangsun, D.; Luo, S.; Chen, R. & Tang, K. (2007). Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane. *Biología*, 62, 386-393. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0096-2>
- Zhao, Y.; Kim, J. Y.; Karan, R.; Jung, J. H.; Pathak, B.; Williamson, B.; Kannan, B.; Wang, D.; Fan, C.; Yu, W.; Dong, S.; Srivastava, V. & Altpeter, F. (2019). Generation of a selectable marker free, highly expressed single copy locus as landing pad for transgene stacking in sugarcane. *Plant molecular biology*, 100 (3), pp. 247-263. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00856-4>
- Zhu, Y. J.; McCafferty, H.; Osterman, G.; Lim, S.; Agbayani, R.; Lehrer, A.; Schenck, S. & Komor, E. (2011). Genetic transformation with untranslatable coat protein gene of sugarcane yellow leaf virus reduces virus titers in sugarcane. *Transgenic research*, 20 (3), pp. 503-512. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9432-3>



## LOS AUTORES

### **Jershon López-Gerena**

---

Biólogo de la Universidad del Valle. En 2006 recibió Ph.D. en Fitopatología con énfasis en Biología Molecular de Kansas State University, USA. Diplomado en Bioinformática 2016 y Diplomado en Alta Gerencia 2013. Entre el año 1993 a 2000 fue asistente de investigación en La Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Desde 2006 es Biotecnólogo del Área de Biotecnología, Programa de Variedades del Centro de investigación de la caña de azúcar de Colombia, Cenicaña. Treinta años de experiencia científica y técnica especialmente en la identificación de marcadores moleculares y genes asociados con variables de productividad, resistencia a plagas y enfermedades. Experiencia a nivel administrativo en coordinación, gestión de proyectos y bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (OGM). Ha sido tutor de estudiantes de pregrado y posgrado e investigador principal y co-investigador de proyectos cofinanciados por MinCiencias y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Actualmente lidera la línea de investigación en Transformación Genética y Edición Genómica aplicados al mejoramiento molecular de la caña de azúcar.

### **Hugo Arley Jaimes Quiñones**

---

Biólogo con énfasis en genética egresado de la Universidad del Valle en el año 2005. Llevó a cabo su trabajo de grado en el tema de transformación genética de Yuca en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) entre los años 2003 y 2005, donde luego trabajó en proyectos de investigación relacionados con resistencia varietal a plagas en frijol y evaluación molecular de plantas transgénicas de arroz hasta el año 2008. A partir de Octubre de 2008 se unió al laboratorio de biotecnología del Centro de investigación de la caña de azúcar de Colombia, Cenicaña como asistente de investigación en proyectos relacionados con transformación/edición genética, genómica y transcriptómica de caña de azúcar. Actualmente se encuentra involucrado proyectos de selección asistida por marcadores para la implementación de las estrategias GWAS y Selección Genómica para asistir procesos de mejoramiento en Cenicaña.



Transformación  
y edición genética de  
la caña de azúcar

[www.cenicana.org](http://www.cenicana.org)