

Transformación de plantas de caña de azúcar susceptibles al síndrome de la hoja amarilla

Transformation of sugar cane plants susceptible to yellow leaf virus

María Paola Rangel*, Eddie Tabares**, Zaida Lentini**, Joe Tohme**, Erik Mirkov***, Jorge Victoria*, Fernando Ángel*

RESUMEN

El síndrome de la hoja amarilla es una enfermedad de la caña de azúcar que fue detectada en Colombia por primera vez en 1998. Cenicaña está tratando de lograr un control eficiente de la enfermedad utilizando diferentes herramientas pertenecientes a diversas áreas como entomología, patología, biología molecular y biotecnología. Dentro de estas dos últimas áreas, está contemplado el producir plantas transgénicas resistentes a la enfermedad. Con este fin se han bombardeado callos de la variedad CC 84-75 con parte del gen que codifica para la cápside del virus causante de la enfermedad, el cual confiere resistencia contra el virus como se ha demostrado previamente. Un número total de 69 plantas han sido obtenidas después de bombardeo y selección con 50 mg/L de genética. Hasta ahora 12 plantas de un total de 19 plantas evaluadas han resultado positivas mediante la técnica de "Southern" después de hibridación, mostrando un fragmento de 0,45 Kb después de digestión del ADN total con *Pst I*. Las plantas que den positivas usando "Southern" serán posteriormente evaluadas mediante "Northern", y su resistencia contra el virus será evaluada en invernadero de bioseguridad.

Palabras clave: Caña de azúcar, transformación genética, virus, *Saccharum*.

ABSTRACT

Yellow leaf syndrome in sugarcane was detected in 1998 for the first time in Colombia. In order to control this syndrome Cenicaña is using several approaches including different disciplines as Entomology, Pathology, Molecular Biology and Biotechnology. One of this approach is the production of transgenic plants resistant to the virus causal agent of the syndrome. For this purpose embryogenic calli of variety CC 84-75 have been bombarded. This variety is susceptible to the syndrome and is largely grown in Colombia. The genomic construction used in the bombardments includes a sequence coding for the coat protein of the virus. Sixty nine plants have been regenerated after selection with geneticin (50 mg/L). So far, 12 plants were positive using Southern Blot showing a 0.45 Kb fragment in the *Pst I* digests. Positive plants by Southern will be tested by Northern and resistance to the virus will be evaluated in biosafety greenhouse.

Key words: Sugarcane, genetic transformation, virus, *Saccharum*.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de la hoja amarilla es una enfermedad de la caña de azúcar registrada por primera vez en 1994 en Hawái (Schenk *et al.*, 1994). Sin embargo, desde 1968 existen registros de sintomatología similar en cultivos del oriente de

África (Ricaud, 1968). En los últimos cinco años se ha observado en las zonas cañeras de Brasil, Argentina, El Salvador, Guatemala, Mauricio, Suráfrica, Malawi, Marruecos, Reunión, Estados Unidos, Perú, Australia y Zimbabwe. En Brasil,

* Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia Cenicaña. A.A. 9138, Cali, Valle. e-mail: fangel@cenicana.org

** Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. A.A. 6713, Cali, Valle.

*** Texas A&M University, Weslaco, TX 78596.

esta enfermedad ha sido detectada principalmente en la variedad SP 71-6163; presenta síntomas severos e indica alta sensibilidad hacia el virus, lo que ha representado pérdidas en la productividad hasta de un 80%.

El síndrome de la hoja amarilla fue registrado en Colombia por primera vez en mayo de 1998 en la variedad SP 71-6163, encontrándose en análisis posteriores en la mayoría de lotes comerciales sembrados con diferentes variedades (Victoria *et al.*, 1998). La incidencia de la enfermedad en el año 2000 fue de 4,3%, presentando mayor incidencia en algunas variedades, especialmente la variedad CC 84-75, la cual ocupa actualmente el segundo lugar en área sembrada en Colombia, lo que indica el alto riesgo para la industria azucarera colombiana y el peligro inminente en caso de no realizar un control adecuado de ella. Esta enfermedad se ha encontrado asociada con disminuciones en la concentración de sacarosa y en la producción de caña, incluso en cultivos sin síntomas externos visibles. En Colombia, como se mencionó anteriormente, la variedad más afectada por la enfermedad es la CC 84-75, la cual mostró una disminución de 1,2 toneladas de caña por hectárea y 0,21 toneladas de azúcar por hectárea menos por cada 1% de infección.

La enfermedad es causada por un virus ARN de la familia Luteoviridae y es producto de recombinación entre ancestros de los géneros *Luteovirus* y *Polerovirus*. El diagnóstico de la enfermedad en el campo es difícil debido a que no todas las variedades de caña muestran síntomas externos. El virus puede ser detectado en el laboratorio por microscopía electrónica, pruebas inmunológicas como ELISA, "dot blot" y "tissue blot", y más recientemente con pruebas moleculares mediante RT-PCR. El virus se disemina por el uso de semilla vegetativa infectada o por la acción de los áfidos *Melanaphis sacchari* y *Rhopalosiphum maidis*, ambos presentes en las zonas azucareras de Colombia; no se ha registrado transmisión en forma mecánica.

Uno de los objetivos de Cenicaña es el de mantener la productividad actual del cultivo de la caña de azúcar, considerada una de las más altas del mundo, mediante la realización de un control eficiente de la enfermedad, utilizando de una forma integral diferentes herramientas y métodos pertenecientes a diversas áreas como entomología, patología, biología molecular y biotecnología. En el área de biotecnología, uno de los sistemas más prometedores consiste en la producción de plantas transgénicas resistentes al virus. La produc-

ción y utilización de este material puede contribuir enormemente al control de la enfermedad, generando por medio de la ingeniería genética, plantas resistentes a esta enfermedad tan importante en Colombia.

El virus del síndrome de la hoja amarilla es un virus ARN y ha sido aislado, purificado, caracterizado, clonado y en parte secuenciado (Moonan *et al.*, 2000). El virus fue clonado en varios fragmentos de ADN complementario, y su mapa genómico construido con base en los clones de ADN producidos. Varios clones que codifican para parte de la proteína de la cápside viral han sido evaluados para conferir resistencia a la enfermedad mediante transformación genética. Uno de los clones fue escogido como el más eficiente para conferir resistencia a la enfermedad, y ha sido incluido en una construcción genética que contiene el promotor del gen de ubiquitina de maíz, su correspondiente intrón, el gen o clon de ADN complementario y la señal correspondiente de terminación. Con el objetivo de obtener plantas de la variedad CC 84-75 resistentes al síndrome de la hoja amarilla, se han bombardeado callos embriogénicos con esta construcción genética acompañada del gen de resistencia a kanamicina utilizado como gen de selección.

METODOLOGÍA

La metodología que se utilizó para la transformación de caña de azúcar fue la de bombardeo de partículas, usando un sistema de aceleración de partículas de oro PDS-1000/He. El tejido óptimo para ser bombardeado es el callo embriogénico, el cual fue inducido a partir de un explante de tallo con meristemo y el primer tercio basal de las hojas o explante de hoja joven en un medio de inducción de callos que contiene sales MS completo, 3% sacarosa, 100 mg/L de inositol, 3 mg/L de 2,4-D, 15% de agua de coco y 0,2% de phytagel, en condiciones de oscuridad y 28°C por aproximadamente cinco semanas. Posteriormente, los callos producidos se subcultivaron cada cuatro semanas previa división de éstos y cambio a medio nuevo de inducción.

Para la estandarización del bombardeo se emplearon los plásmidos pGV1040, pCambia 1301, pCambia 1201 y pActina-1D. Posteriormente se bombardeó con el plásmido pFM395 junto con el gen de resistencia al antibiótico utilizado como agente de selección y el plásmido pFM396, el cual contiene el gen antisentido. Los callos fueron seleccionados inicialmente en 30 mg/L de genética y posteriormente en 50 mg/L.

Los callos bombardeados que sobrevivieron fueron pasados a medio de regeneración, en el cual se eliminaron las hormonas de crecimiento, se disminuyó la concentración de agua de coco a 5% y de sacarosa a 2%, agar 0,4% y se adicionó carbón activado al 0,2% como agente antioxidante. Se hizo una exposición gradual de los callos a la luz, empezando con 15 días en oscuridad, luego 15 días en penumbra y finalmente fueron expuestos a luz directa. Posteriormente, una vez las plantulitas midieron 5 mm se pasaron a medio de propagación de meristemos y elongación denominado MS I (sales MS completo, de sacarosa 2%, 100 mg/L de inositol, 0,01 mg/L de IBA, 0,1 mg/L de GA_3 , 150 mg/L de ácido cítrico y 5% de agua de coco) bajo luz directa hasta que lograron un tamaño aproximado de 2 cm.

Después se pasaron a medio de macollamiento MS II (sales MS completo, sacarosa 2%, 100 mg/L de inositol, 0,1 mg/L de KIN, 0,3 mg/L de BAP, 150 mg/L de ácido cítrico) bajo luz directa. Finalmente, las plantas fueron puestas en medio de enraizamiento MS III (sales MS completo, 2% de sacarosa, 100 mg/L de inositol, 0,1 mg/L de KIN, 5 mg/L de ANA) bajo luz directa.

RESULTADOS

Con el fin de estandarizar la metodología, inicialmente se usaron varios plásmidos que contienen el gen GUS como pGV 1040, pCambia 1301, pCambia 1201 y pActina 1-D. Los porcentajes de eficiencia medida en número de callos GUS positivos variaron entre 0 y 85% siendo el plásmido pActina 1-D el más eficiente, ya que fue el único que produjo porcentajes por encima del 65%. Debido a lo aleatoria que es la metodología de bombardeo de partículas, en los resultados obtenidos con este plásmido como con los anteriores, la respuesta fue muy variable. En algunos experimentos se obtuvo casi un 80% de callos GUS positivos mientras que en otros sólo se obtuvo un 15%. Los resultados de los ensayos realizados con el plásmido pActina 1-D se indican en la tabla 1. En la figura 1 se muestran callos transformados con el plásmido pActina 1-D expresando el gen GUS.

Una vez estandarizada la metodología de transformación con el gen GUS, se utilizó el plásmido pFM395 junto con el plásmido que posee el gen de resistencia a

Tabla 1. Bombardeos realizados con el plásmido pActina 1-D en diferentes experimentos.

Experimento	No. de callos disparados	No. de callos GUS +	No. de callos GUS -	% de callos GUS +
1	161	103	58	64,0
2	184	156	28	84,8
3	215	122	93	56,7
4	150	23	127	15,3
5	112	31	81	27,7

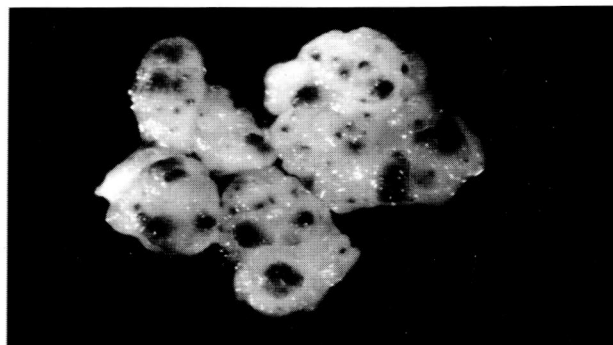


Figura 1. Callos embriogénicos de la variedad CC 84-75, que muestran expresión transitoria del gen GUS.

kanamicina y el plásmido pFM396 con el gen antisentido, con el fin de obtener más frecuencia de plantas transformadas como se demostró previamente (Waterhouse *et al.*, 1998). El plásmido pFM395 contiene parte de la cápside viral, el promotor del gen de ubiquitina, su correspondiente intrón y la señal de terminación.

Trece experimentos diferentes fueron realizados de una forma independiente. Como se mencionó anteriormente, debido a lo aleatorio del método el número final de callos y el número de plantas regeneradas obtenidas varió entre cada ensayo (véase tabla 2). En un comienzo se bombardeó un número de callos determinado, los cuales fueron seleccionados inicialmente en genética a una concentración de 30 mg/L. Los callos sobrevivientes fueron seleccionados nuevamente con el mismo antibiótico a una concentración de 50 mg/L y los que sobrevivieron fueron colocados en medio de regeneración. El mayor número de plantas regeneradas se obtuvo en los experimentos 4 y 2, en los cuales sobrevivieron después de la selección con el antibiótico 11 y 9 callos, a partir de los cuales se obtuvieron 20 y 12 plantas, respectivamente. En total se obtuvieron 69 plantas a partir de 57 callos resistentes a 50 mg/L de genética en trece experimentos.

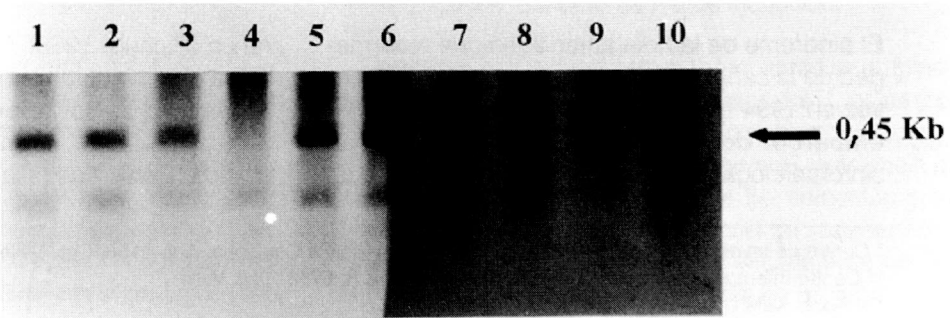
Tabla 2. Bombardeos realizados con los plásmidos pFM395, pFM 396 y el gen de resistencia al antibiótico en diferentes experimentos.

Experimento	No. de callos bombardeados	No. de callos en 30 mg/L	No. de callos en 50 mg/L	No. de callos vivos	No. de plantas regeneradas
1	136	1	0	0	0
2	147	40	26	9	12
3	166	30	5	1	4
4	258	137	112	11	20
5	280	65	40	2	9
6	184	120	33	8	8
7	182	122	49	0	0
8	198	158	51	12	6
9	177	160	41	9	7
10	397	237	71	2	2
11	112	6	4	0	0
12	141	40	13	3	1
13	111	25	0	0	0

Hasta ahora 19 plantas han sido evaluadas mediante Southern blot, de las cuales 12 han dado positivas después de la hibridización (véase figura 3). El ADN total de las plantas fue digerido con la enzima *Pst* I e hibridizado con el plásmido pFM395. Las plantas positivas mostraron una banda de 0,45 Kb (carriles 1-3 y 5-10), la cual no fue detectada en la planta no transformada usada como control (carril 4). Actualmente se están realizando las hibridizaciones con las otras plantas después de digestión con diferentes enzimas de restricción con el objetivo de conocer el número de inserciones diversas. La hibridización del ARN mediante “Northern Blot” y la evaluación de la resistencia contra el virus de las plantas hasta ahora positivas mediante Southern se están realizando en la actualidad.

Figura 2. Estructura del plásmido pFM395 con parte del gen que codifica para la cápside viral de 487 pb (en negro), y los sitios de corte para las diferentes enzimas de restricción.

Figura 3. “Southern blot” de ADN provenientes de diferentes plantas hibridizados con el plásmido pFM395. La sonda fue marcada con sistema no radioactivo e hibridizada a 65°C. Los lavados se realizaron con 2XSSC, 1XSSC y 0,5XSSC a 65°C por 20 minutos cada uno. Todos los lavados incluyeron 0,1% de SDS. El carril 4 contiene ADN de la variedad CC 84-75 no transformada.



DISCUSIÓN

Varios grupos de investigación en diferentes partes del mundo han logrado transformar plantas de caña de azúcar utilizando bombardeo de partículas y el gen marcador GUS. Franks y Birch (1991) fueron los primeros en lograr expresión transitoria y persistente del gen GUS en células en suspensión y en callos de la variedad australiana Q63. Estos autores encontraron más alta frecuencia de expresión en las células en suspensión que en los callos. Sin embargo sugieren a los callos embriogénicos como tejido ideal para transformar, debido a su fácil producción y su corto tiempo en cultivo, lo cual reduce la frecuencia de variación somaclonal. Chowdhury y Vasil (1992) lograron introducir los genes GUS y bar mediante bombardeo en células en suspensión en los híbridos CP72-1210 y SC88 de la Florida. Otra línea celular (SCPP) fue transformada mediante electroporación de protoplastos. Estos autores demostraron integración estable del gen bar y actividad PAT (fosfinotricina acetil transferasa). Gallo-Meagher e Irvine (1993) lograron expresión transitoria del gen GUS en el cultivar Nco 310, utilizando como explantes secciones de hojas jóvenes. En este trabajo se compararon los promotores del gen de ubiquitina de maíz (*Ubi-1*) el de actina de arroz (*Act 1*) y el 35S del virus del mosaico de la coliflor. La mayor expresión la obtuvieron con el promotor *Ubi-1*, el mismo que fue utilizado en el presente trabajo. Otros autores obtuvieron resultados similares utilizando otros cultivares diferentes (Gonzales-Cabrera *et al.*, 1998). Bower *et al.* (1996) transformaron callos embriogénicos de la variedad australiana Q117 utilizando el gen GUS, lograron resultados similares a los obtenidos por Chowdhury y Vasil, quienes usaron construcciones genéticas similares.

Otros genes marcadores como el gen que codifica para la proteína fluorescente (GFP) han sido utilizados mediante bombardeo de partículas (Harrison *et al.*, 2001; Elliot *et al.*, 2001) y *Agrobacterium tumefaciens* (Elliot *et al.*, 1999), obteniendo la eliminación de una alta proporción de explantes negativos mediante selección visual, facilitando así enormemente la selección de células transgénicas como primer paso en la generación de plantas transgénicas. Gallo-Meagher e Irvine (1996) evaluaron oro y tungsteno como partículas de vehículo para evaluar la eficiencia de transformación utilizando el gen bar, encontrando resultados muy similares; ellos demos-

traron integración y expresión del gen mediante análisis moleculares en la variedad Nco 310; el porcentaje de plantas PCR positivas obtenidas a partir de plantas regeneradas fue de 58%.

En Brasil, Falco *et al.* (2000) transformaron – mediante bombardeo –, callos de la variedad SP80-180 con dos plásmidos que contienen los genes de neomicina transferasa (neo) y fosfinotricina acetiltransferasa (bar) con una pistola desarrollada en el Centro Tecnológico de Copersucar. Otro factor importante ha sido el de buscar resistencia a insectos mediante transformación, utilizando genes *cry*. Con este fin se ha utilizado el gen *cryIA(b)* para obtener resistencia contra el barrenador del tallo *Diatraea saccharalis* (Arencibia *et al.*, 1997) o, utilizando inhibidores de proteasas o lectinas de otros cultivos como papa, se ha tratado de inhibir el crecimiento de larvas de *Antitroglus consanguineus* (Nutt *et al.*, 1999).

Respecto a la resistencia a virus, pocos trabajos se han realizado. Uno de los virus más estudiados es el del mosaico de la caña de azúcar, del cual se ha utilizado la proteína de la cápside y el gen de la replicasa para realizar construcciones genéticas con el fin de bombardearlas en variedades australianas (Joyce *et al.*, 1998; Ingelbrecht *et al.*, 1999; Butterfield *et al.*, 2002). Otro virus estudiado es el causante de la enfermedad de Fiji. Esta enfermedad, que no se encuentra presente en Colombia, es transmitida por *Perkinsiella saccharicida* y es muy importante en Australia. Mediante bombardeo se han introducido construcciones del virus en la variedad Q124 obteniendo resultados de resistencia significativos (McQualter *et al.*, 2001). Concerniente al virus del síndrome de la hoja amarilla, la construcción utilizada en el presente trabajo mostró previamente que confiere resistencia a plantas susceptibles a la enfermedad (Mirkov, resultados no publicados); por esta razón, esta construcción fue escogida en el presente trabajo, y es el único trabajo hasta la fecha que ha utilizado construcciones genéticas con el fin de obtener resistencia al síndrome de la hoja amarilla; por ello no podemos comparar nuestros resultados con los de otros autores.

Como se mencionó en la parte de resultados, 12 de las 19 plantas evaluadas fueron positivas por medio de la técnica de hibridización molecular (Southern Blot). En este experimento se utilizó como

sonda el plásmido pFM395, el cual fue previamente cobombardado con el gen de selección o de resistencia al antibiótico. Por esta razón es posible que las siete plantas que no dieron hibridización positiva tengan el gen de selección pero no tengan el plásmido pFM395. Este problema se solucionaría si se tuviera en la misma construcción todos los genes que se quieren introducir en la planta transgénica.

A pesar de que las monocotiledoneas no se consideran huéspedes naturales de *Agrobacterium tumefaciens* (De Cleene y Deley, 1976) algunos grupos de investigación recientemente han intentado transformar algunas de ellas usando este vector, especialmente arroz (Chan *et al.*, 1993; Hiei *et al.*, 1994), trigo (Mooney *et al.*, 1991), maíz (Ishida *et al.*, 1996) y caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1998; Enríquez-Obregón *et al.*, 1998; Matsuoka *et al.*, 2001). La transformación con *A. tumefaciens* tiene ventajas sobre el bombardeo de partículas como la posibilidad de introducir fragmentos de mayor tamaño y tener menos rearreglos del transgén. Ésta podría ser una nueva alternativa para la producción de plantas resistentes al síndrome de la hoja amarilla en un futuro cercano. Sin embargo, el trabajo que resta por ahora de la presente investigación es evaluar las plantas producidas mediante hibridización del ADN (Southern), del ARN (Northern) y medir la respuesta a la infección por el virus en las plantas que resultan positivas por métodos moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Colciencias por apoyar a María Paola Rangel en la parte financiera.

BIBLIOGRAFÍA

- Arencibia A., Vázquez R. I., Prieto, D., Téllez, P., Carmona E.V., Coego A., Hernandez L., De la Riva G., Selman-Housein G. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding*. 3: 247-255.
- Arencibia A., Carmona, E. R., Téllez, P., Chan, M., Yu, S., Trujillo, L. E., Oramas, P. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp.* L.). Transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*. 7: 213-222.
- Bower, R., Elliot, A. R., Potier, B. A. M., Birch, R.G. 1996. High efficiency microprojectile mediated cotransformation of sugarcane using visible or selectable markers. *Molecular Breeding*. 2: 239-249.
- Butterfield, M. K., Irvine, J. E., Valdez Garza, M., Mirkov, E. 2002. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. *Theor. Appl. Genet.* 104: 797-803.
- Chan, M. T., Chan, H. H., Ho, S. L., Tong, W. F., Yu, S. M. 1993. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha amylase promoter beta glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.* 22: 491-506.
- Chowdhury, M. K. U., Vasil, I. K. 1992. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports*. 11: 494-498.
- De Cleene, M., Deley, J. 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42: 389-466.
- Elliot, 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: 707-714.
- Elliot, A. R., Waltishbuhl, D., Pearson, R. 2001. Development of an ELISA technique for sensitive GFP quantification in Transgenic sugarcane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 24: 670-672.
- Enríquez-Obregón G. A., Vázquez-Padrón, R. I., Prieto-Samsonov, D. L., De la Riva, G. A., Selman-Housein, G. 1998. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta*. 206: 20-27.
- Falco, M. C., Neto, A. T., Ulian, E. C. 2000. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. *Plant Cell Reports*. 19: 1188-1194.
- Franks, T., Birch, R. G. 1991. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 471-480.

- Gallo-Meagher, M., Irvine, J. E. 1993. Effects of tissue type and promotor strength on transient GUS expression in sugarcane following particle bombardment. *Plant Cell Reports*. 12: 666-670.
- Gallo-Meagher, M., Irvine, J. E. 1996. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. *Crop Sci*. 36: 1367-1374.
- Gonzales-Cabrera, J., Coego-Gonzales, A., Martínez-Gil, A. F., De la Riva, G. A., Vázquez-Padrón R. I. 1998. Optimization of transgene expression in sugar cane cells. *Biotechnology Techniques*. 12: 793-796.
- Harrison, D. K., Bower, R., Berding, N., Carrol, B. J. Birch, R. G. 2001. Inheritance and expression of transgenes in sugarcane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol*. 24: 663-664.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*. 6: 271-282.
- Ingelbrecht, I. L., Irvine, J. E., Mirkov, T. E. 1999. Posttranscriptionally gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiology*. 119: 1187-1197.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*. 14: 745-750.
- Joyce, P. A., McQualter, R. B., Handley, J. A., Dale, J. L., Harding, R. M., Smith, G. R. 2001. Transgenic sugarcane resistant to sugarcane mosaic virus. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol*. 20: 204-210.
- Matsuoka, M., Ideta, O., Tanio, M., Hayakawa, A., Miwa H. 2001. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of sugarcane using cell suspension culture with a novel method. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol*. 24: 660-662.
- McQualter, R. B., Harding, R. M., Dale, J. L., Smith, G. 2001. Virus derived transgenes confer resistance to Fiji disease in transgenic sugarcane plants. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol*. 24: 584-585.
- Moonan, F., Molina, J., Mirkov, E. 2000. Sugarcane Yellow Leaf Virus: An emerging virus that has evolved by recombination between Luteoviral and Poleroviral ancestors. *Virology*. 269: 156-171.
- Mooney, R., Goodwin, P., Dennis, E., Llewellyn, D. 1991. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer into wheat tissues. *Plant Cell Tissue Orga. Cult*. 25: 209-218.
- Nutt, K. A., Allsopp, P. G., Mcghie, T. K., Sheperd, K. M., Joyce, P. A., Taylor, G. O., McQualter, R. B., Smith, G. 1999. Transgenic sugarcane with increased resistance to cane grubs. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol*. 21: 171-176.
- Ricaud, C. 1968. Yellow wilt of sugarcane in Eastern Africa. *Sugarcane Pathologist Newsletter*. 1: 45-49.
- Schenck, S., Hu, J. S., Lockhart, B. E. 1994. Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane virus in Hawai. *Sugarcane*. 4: 5-8.
- Victoria, J. L., Garcés, F., Guzmán, M. L., Ángel, F. 1998. Síndrome de la hoja amarilla en Colombia. *Carta Trimestral (Cenicaña)* Año 20, No. 2-3:3-7.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., Wang, M. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 95: 13959-13964.