

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO CROMOSÓMICO DE UN GRUPO DE CLONES SILVESTRES DE ORIGEN DESCONOCIDO Y CLONES DE FUNDACIÓN DEL COMPLEJO *Saccharum*

Roxana Portieles[✉], Raisa Rodríguez, Ingrid Hernández, E. Canales y María T. Cornide

ABSTRACT. Sugarcane belongs to *Saccharum* genus, an Andropogoneae member of the Gramineae family (Poaceae). Other genera such as *Erianthus* and *Miscanthus* are related with *Saccharum* complex which could have contributed to crop evolution. *Saccharum* genus is characterized by a high polyploidy and a frequent aneuploidy; therefore, classical cytological studies were carried out to give a general information about sugarcane cytogenetics and to base breeding programs. The main objective of this paper was the cytogenetic characterization through chromosomal count of new wild clones of *Saccharum* complex coming from “Cuba-Laos” collecting expedition, to confirm its taxonomic identification, which had been previously reported by molecular descriptors, also to determine the genetic stability of most promising wild clones for its further application to nobilization.

Key words: sugarcane, cytogenetics, karyotypes, *Saccharum*, clones, wild plants

RESUMEN. La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum*, miembro de la tribu Andropogoneae de la familia Gramineae (Poaceae). Otros géneros como *Erianthus* y *Miscanthus* están relacionados con el complejo *Saccharum* y pudieron haber contribuido a la evolución del cultivo. El género *Saccharum* se caracteriza por una alta poliploidía y una aneuploidía frecuente, por lo que se han llevado a cabo estudios citológicos clásicos, para brindar información general sobre la citogenética de la caña de azúcar y para fundamentar los programas de mejoramiento. El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización citogenética mediante conteo cromosómico de un grupo de nuevos clones silvestres provenientes de una expedición de colecta “Cuba-Laos” del complejo *Saccharum*, para corroborar su identificación taxonómica, previamente informada mediante descriptores moleculares y determinar la estabilidad genética de los clones silvestres más promisorios para su empleo ulterior en la nobilización.

Palabras clave: caña de azúcar, citogenética, cariotipos, *Saccharum*, clones, plantas silvestres

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum*, todos sus miembros son altamente poliploides y genéticamente complejos (1).

Una de las principales limitantes del mejoramiento de la caña de azúcar es la estrecha base genética con que cuenta, para obtener nuevas variedades resistentes a estrés bióticos y abióticos, así como para las características acordes a la diversificación de su producción.

La principal vía de introducción de nuevos genes es a través de la hibridación introgresiva, utilizando como progenitor femenino recurrente la especie que aporta el alto contenido azucarero, *Saccharum officinarum*, y otras

especies, principalmente *S. spontaneum* (2). Además, ocasionalmente se utilizan géneros afines tales como *Sclerostachya*, *Narenga*, *Miscanthus* y *Erianthus* sect. *Rapidium* Henrad. Todos estos géneros están relacionados con el complejo *Saccharum* y pudieran haber contribuido a la evolución del cultivo de la caña de azúcar (3). *Erianthus* ha sido uno de los géneros más atractivos con fines de mejoramiento, pues sus especies tienen tallos vigorosos, medulares y con bajo contenido azucarero. Cuando se cruzan con clones del complejo *Saccharum*, se obtienen posturas vigorosas, las cuales después de dos o tres ciclos de retrocruces con híbridos o con clones de este complejo, se producen cultivares con alto contenido azucarero y con una mejor adaptabilidad para el crecimiento en condiciones de estrés (1, 4).

La complejidad genética de estas especies, las cuales presentan diferentes niveles de ploidía, unido a la presencia eventual de gametos no reducidos, hacen del proceso de nobilización un programa largo, costoso y poco preciso.

Roxana Portieles e Ingrid Hernández, Investigadoras; Raisa Rodríguez y Ms.C. E. Canales, Investigadores Agregados y Dra.C. María T. Cornide, Investigador Titular del Departamento de Bioplantitas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CINIC), Ave. 25 y 158, Apdo. 6880, Ciudad de La Habana.

✉ roxana@biocnic.cneuro.edu.cu

Los marcadores moleculares y los métodos de análisis citogenéticos permiten identificar los híbridos y seleccionarlos por su estabilidad cromosómica en cada etapa del proceso, aumentando considerablemente su eficiencia. Por otra parte, desde el punto de vista citológico, para el género *Saccharum* se han presentado variaciones en cuanto al número de cromosomas entre células pertenecientes a una misma planta y aún a un mismo tejido. La ocurrencia de este fenómeno de mosaicismo cromosómico ha sido explicado por varios autores (5).

El sureste asiático constituye un centro de diversificación importante de estas especies. Para ampliar la base genética del programa cubano, se efectuó una expedición de colecta "Cuba-Laos, ECL" (6). Un grupo de clones fueron seleccionados como promisorios por su vigor y resistencia a estrés (7). Estos fueron caracterizados y agrupados por su diversidad genética, mediante marcadores moleculares, lo cual permitió establecer grupos de diversidad genética para auxiliar su empleo en la nobilitación. Como resultado de la caracterización botánica y por descriptores moleculares, éstos fueron identificados taxonómicamente (8).

El presente trabajo tuvo como objetivos confirmar mediante conteo cromosómico, la identificación taxonómica efectuada y determinar la estabilidad genética de los clones silvestres más promisorios para su empleo ulterior en la nobilitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se estudió un grupo de 36 clones silvestres colectados en el Sudeste Asiático (6), así como seis clones testigos de *Saccharum spontaneum* y *Erianthus* spp. (Tabla I). El material vegetal fue suministrado por la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Matanzas (INICA). **Conteo de cromosomas.** Para cada clon estudiado, se tomaron muestras de dos plantones escogidos al azar, y de cada individuo muestreado, se tomaron trozos de tallo de los tercios medio e inferior conteniendo de dos a tres entrenudos. Luego de su esterilización con bicloruro de mercurio al 0.1 %, se pusieron a germinar en la estufa a una temperatura de 36 a 38 °C, la humedad se mantuvo tapándolos con papel Kraft. Las raíces de aproximadamente 1 cm de longitud fueron pretratadas con 8-hidroxiquinolina al 0.002 % durante tres horas a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con agua destilada. La fijación se realizó en una mezcla de etanol-ácido acético glacial (3:1), durante 24 horas. Después de lavarse con agua destilada, se conservaron en etanol al 70 % a 10°C. Las raíces se hidrolizaron en HCl 1N a 60°C durante 15 minutos y una vez lavadas en agua destilada se realizó la tinción con hematoxilina de Gomori durante dos horas a 60°C. A los ápices colocados en el portaobjeto se les añadió gota a gota HAc glacial al 45 %. Luego de colocado el cubreobjeto, se flameó la preparación y se realizó el *squash*. Por último, se observaron las preparaciones en un microscopio óptico Olympus Vanox-T con cámara fotográfica acoplada y se contaron los números cromosómicos en 50 células por clon, fotografiándose las mejores placas metafásicas.

Tabla I. Relación de los clones estudiados e identificación molecular

Nombre	Identificación molecular (9)		
	PCR 500 pb	ADNr 320 pb	5S Citofondos RFLP
Testigos:			
<i>S. spontaneum</i> L.:			
Tabongo	-	+	B
SES182	-	+	B
SES13	-	+	B
<i>Erianthus</i> :			
<i>E. elegans</i>	+	-	D
<i>E. sara</i>	+	-	D
<i>E. arundinaceus</i>	+	-	-
Clones ECL:			
ECL1-6-85	-	+	-
ECL1-7-85	-	+	C
ECL1-8-85	-	+	-
ECL1-10-85	-	+	-
ECL1-12-85	-	+	C
ECL1-14-85	-	+	-
ECL1-15-85	-	+	-
ECL1-17-85	-	+	-
ECL1-18-85	-	+	-
ECL1-19-85	-	+	-
ECL1-26-85	-	+	C
ECL1-32-85	-	+	-
ECL1-33-85	-	+	C
ECL1-35-85	-	+	-
ECL1-36-85	-	+	-
ECL1-37-85	-	+	-
ECL3-1-85	-	+	-
ECL3-2-85	-	+	-
ECL3-3-85	-	+	-
ECL3-5-85	-	+	C
ECL3-8-85	-	+	-
ECL3-10-85	-	+	-
ECL3-11-85	-	+	-
ECL3-13-85	-	+	-
ECL3-14-85	-	+	-
ECL3-15-85	-	+	-
ECL4-3-85	-	+	-
ECL6-7-85	-	+	-
ECL6-8-85	-	+	-
ECL6-10-85	-	+	-
ECL1-24-85	+	-	E
ECL1-30-85	+	-	E
ECL6-6-85	+	-	E
ECL6-1-85-1	+	-	-
ECL5-4-85	+	-	C
ECL1-29-85	+	-	C

ECL- colección expedición "Cuba-Laos"

B-E- diversidad citoplasmática de los clones ECL respecto al resto de los clones

B- clones pertenecientes a *S. spontaneum*

C- clones ECL que ocupan una posición intermedia, cerca de los clones *Saccharum*

D- clones pertenecientes al género *Erianthus*

E- clones ECL que ocupan su posición dentro de *Erianthus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla II se muestran los resultados del conteo de cromosomas de cada clon estudiado.

En los clones Tabongo, *E. elegans*, *E. sara* y *E. arundinaceus*, utilizados como testigos, el número de cromosomas obtenido coincide con lo informado en la literatura: Tabongo con $2n=80$ (Figura 1a) coincide con otros informes (9), *E. elegans* con $2n=40$ coincide con algunos autores (10), mientras que para *E. Sara* ($2n=40-60$) (Figura 1b) y *E. arundinaceus* ($2n=40-60$), el recorrido cromosómico obtenido se encuentra entre los valores presentados (11) de $2n=20-60$ y de $2n=30-60$ respectivamente. En el caso de los clones SES 13 y 182, el número de cromosomas no se encontró citado en la literatura consultada.

Tabla II. Número de cromosomas de los clones estudiados

Nombre	2n
Testigos:	
<i>S. spontaneum</i> L.:	
Tabongo	2n=80
SES 182	2n=64-80
SES 13	2n=54-64
<i>Erianthus</i> :	
<i>E. elegans</i>	2n=40
<i>E. sara</i>	2n=40-60
<i>E. arundinaceus</i>	2n=40-60
Clones ECL:	
ECL 1-6-85	2n=54-80
ECL 1-7-85	2n=64-80
ECL 1-8-85	2n=64-80
ECL 1-10-85	2n=56-72
ECL 1-12-85	2n=64-80
ECL 1-14-85	2n=64-80
ECL 1-15-85	2n=64-80
ECL 1-17-85	2n=54-74
ECL 1-18-85	2n=64-76
ECL 1-19-85	2n=60-80
ECL 1-26-85	2n=64-80
ECL 1-32-85	2n=54-76
ECL 1-33-85	2n=60-80
ECL 1-35-85	2n=64-72
ECL 1-36-85	2n=72-80
ECL 1-37-85	2n=58-76
ECL 3-1-85	2n=64-80
ECL 3-2-85	2n=64-80
ECL 3-3-85	2n=56-80
ECL 3-5-85	2n=64-80
ECL 3-8-85	2n=64-80
ECL 3-10-85	2n=58-72
ECL 3-11-85	2n=64-74
ECL 3-13-85	2n=64-74
ECL 3-14-85	2n=64-80
ECL 3-15-85	2n=64-72
ECL 4-3-85	2n=60-72
ECL 6-7-85	2n=54-66
ECL 6-8-85	2n=64-80
ECL 6-10-85	2n=64-80
ECL 1-24-85	2n=30-40
ECL 1-30-85	2n=30-40
ECL 6-6-85	2n=30-40
ECL 6-1-85-1	2n=30-40
ECL 5-4-85	2n=30-40
ECL 1-29-85	2n=30-40

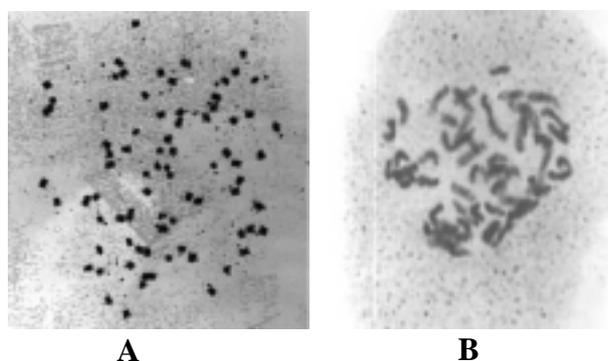


Figura 1. (a) Cariotipo del clon testigo *Saccharum spontaneum*: Tabongo (2n=80) x 400, (b) Cariotipo del clon testigo de *Erianthus*: *E. sara* (2n=53) x 400

La especie *S. spontaneum* presenta un rango de 2n= 40, 42, 44, 54, 56, 64, 72, 80, 96, 112 y 128 cromosomas y un número básico de x= 8 cromosomas (12). Sobre la base de estos datos, se puede decir que los clones ECL 1-6, 1-8, 1-10 (Figura 2a), 1-12, 1-14, 1-15, 1-17, 1-18, 1-19, 1-26, 1-32, 1-33, 1-35, 1-36, 1-37, 3-1, 3-2, 3-3, 3-5, 3-8 (Figura 2b), 3-10, 3-11, 3-13, 3-14, 3-15, 4-3, 6-7, 6-8, 6-10, presentan un recorrido cromosómico comprendido dentro del rango descrito para esta especie, coincidiendo estos resultados con la clasificación morfológica realizada (13) y con los datos moleculares obtenidos por otros autores (14).

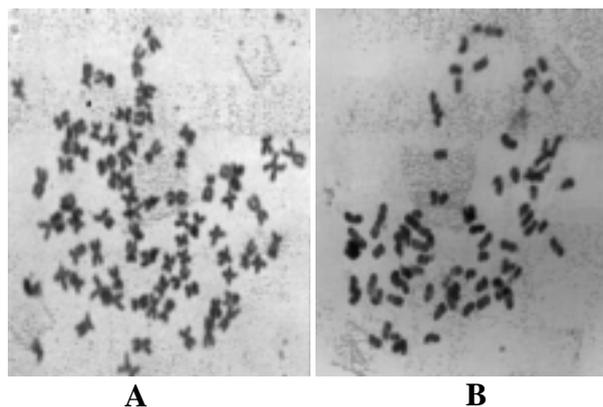


Figura 2. Cariotipos de los clones silvestres del complejo *Saccharum*: (a) ECL 1-10 (2n= 78) x 500, (b) ECL 3-8 (2n= 71) x 500

En el caso de los clones ECL 1-7 y 1-26, caracterizados morfológicamente (13) como representantes del género *Miscanthus*, éstos presentaron un rango cromosómico típico de *Saccharum*, además de amplificar la banda de 320 pb, característica de este género, por lo que pudieran ser ubicados dentro de él y probablemente dentro de la especie *S. spontaneum* L. Este resultado se puede corroborar por las variedades testigos estudiadas, Tabongo 2n=80, SES 182 2n= 60-80 y SES 13 2n=54-64, las cuales pertenecen a la especie *S. spontaneum* L.

Para los clones ECL 1-24, 1-30 (Figura 3a), 6-6, 6-1, 5-4 y 1-29 (Figura 3b), el rango cromosómico de 2n= 30-40, coincide con el descrito en la literatura para el género *Erianthus*, el cual presenta una diversidad genética de 2n= 20, 30, 40, 50, y 60 cromosomas (15, 16), corroborándose este resultado con el número cromosómico obtenido en este trabajo para *E. elegans*, *E. sara* y *E. arundinaceus* de 2n= 40 y 2n= 40-60 respectivamente, y con los resultados de algunos autores (14), donde se obtuvo amplificación específica de *Erianthus*. En el caso de los primeros (ECL 1-24, 1-30, 6-6 y 6-1), su comportamiento citoplasmático es semejante a las especies del género *Erianthus*, por lo que todas las evidencias apuntan a que estos clones pertenecen inequívocamente a este género.

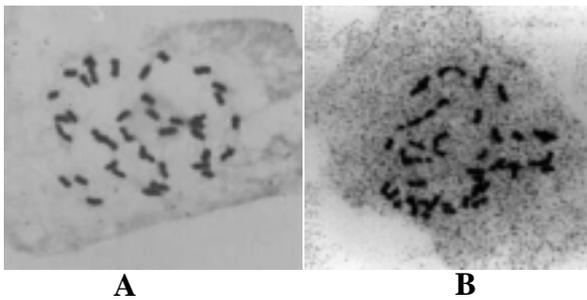


Figura 3. Cariotipos de los clones silvestres de *Erianthus*:
(a) ECL 1-30 (2n= 40) x 400, (b) ECL 1-29
(2n= 42) x 400

Desde el punto de vista citoplasmático, el comportamiento es diferente para los clones ECL 5-4 y 1-29, los cuales se agrupan en el genofondo C, más próximo a la especie *S. spontaneum* L. Teniendo en cuenta que las evidencias nucleares (número de cromosomas y amplificación específica) así como agromorfológicas de estos dos clones los asemejan a *Erianthus*, es de presumir un origen híbrido intergenérico, debiendo ser el progenitor femenino un representante de *Saccharum* y probablemente un *S. spontaneum*, el cual aporta el genoma citoplasmático, seguido por la eliminación en bloque de los cromosomas del progenitor masculino *Erianthus* (17). La ausencia de evidencias nucleares del progenitor *Saccharum* en estas accesiones pudiera explicarse además por el fenómeno de partición genética o fraccionamiento del complemento cromosómico. Este evento ocurre en híbridos formados entre especies que se encuentran alejadas genéticamente, donde los cromosomas pertenecientes a un genoma presentan, como un conjunto, un comportamiento citológico diferente a los restantes genomas del complemento cromosómico, que se manifiesta en asincronías de los ciclos de condensación cromosómica, pudiendo ocurrir la eliminación de cromosomas o incluso del genoma completo de uno de los progenitores (18, 19).

CONCLUSIONES

- Los clones ECL caracterizados citogenéticamente, mediante el conteo del número cromosómico, constituyen nuevas accesiones representantes de los géneros *Erianthus* (ECL 1-24, 1-30, 6-6, 6-1, 5-4 y 1-29) y *Saccharum* (ECL 1-6, 1-7, 1-8, 1-10, 1-12, 1-14, 1-15, 1-17, 1-18, 1-19, 1-26, 1-32, 1-33, 1-36, 1-37, 3-1, 3-2, 3-3, 3-5, 3-8, 3-10, 3-11, 3-13, 3-14, 3-15, 4-3, 6-7, 6-8, 6-10).
- Se demuestra la efectividad del uso conjunto de marcadores citogenéticos y moleculares en la identificación taxonómica de nuevas accesiones de naturaleza poliploide compleja y de origen desconocido, con vistas a su conservación, manejo y mejoramiento genético.

REFERENCIAS

1. Cornide, M. T.; Gálvez, G. Los marcadores moleculares y el programa de mejoramiento de la caña de azúcar. En: Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. La Habana : Ed. Elfos Scintiae, 1999, p 45-62.
2. Glaszmann, J. C.; D'Hont, A. Análisis molecular de la biodiversidad del germoplasma en caña de azúcar. En: Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. La Habana : Ed. Elfos Scintiae, 1999, p 25- 44.
3. Heinz, D. J. Sugarcane Cytogenetics. En: Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution. Londres : Ed. Elsevier, 1991.
4. Roach, B.T. Nubilization of sugarcane. En: Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. (14:1972), 1972. p. 206-216.
5. Heinz, D. J.; Mee, G. W. P.; Nickel, L. G. Chromosome number of some *Saccharum* species, hybrids and their cell suspension cultures. *Am. J. Bot.*, 1969, vol. 56, p. 450-454.
6. Chinaea, A.; Morales, M. Colecta de germoplasma de caña de azúcar en la R.D.P. Laos. En: Conf. Provincial de la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba (7:1987:Matanzas), 1987. p. 10.
7. Prada, F. de. Estudio y utilización de los recursos genéticos de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.). [Tesis de grado], INICA, 1998.
8. Coto, O.; Cornide, M. T.; Calvo, D.; Canales, E.; D'Hont, A.; Prada, F. de. Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with markers. *Euphytica*, 2002.
9. Zabala, R. Utilización de la Citogenética en caña de azúcar (*Saccharum* spp). Curso Regional. Obtención y selección de variedades de caña de azúcar, noviembre, 1996.
10. Roach, B. T. Cytological studies in *Saccharum*. Chromosome transmission in interspecific and intergeneric crosses. En: Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. (13:1969), 1969. p. 901-920.
11. Mehra, P. N.; Kholsa, P. K.; Kholi, B. L. y Koomar, J. S. Cytological studies in the North Indian Grasses. *Res. Bull. Punjab. Univ.*, 1968, vol. 19, p. 157-230.
12. D'Hont, A.; Grivet, L.; Feldmann, P.; Rao, P. S.; Berding, N.; Glaszmann, J. C. Characterization of the double genomic structure of modern sugarcane cultivars, *Saccharum* spp., by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.*, 1996, vol. 250, p. 405-413.
13. Pérez, G.; Bernal, N.; Chinaea, A.; O'Reilly, J. P. y Prada, F. de. Recursos genéticos de la caña de azúcar. Publicaciones IMAGO, 1997, 249 pp.
14. Cornide, M. T.; Coto, O.; Calvo, D.; Canales, E.; Prada, F. de y Pérez, G. Molecular markers for the identification and assisted management of genetic resources for sugarcane breeding. *Plant Varieties and Seeds*, 2000, vol. 13, p. 113-123.
15. Daniels, J.; Roach, B. T. Taxonomy and Evolution. En: Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam : Ed. Elsevier, 1987.
16. Zabala, R.; Pérez, G.; Chinaea, A.; Guerra, M.; Vera, A.; Quintana, F.; Tuero, S.; Díaz, F. y García, H. Estudios citogenéticos en caña de azúcar y géneros afines. Informe final de Proyecto, INICA, 1999.
17. Alexander, M. P. Chromosome elimination in block in *Saccharum*. En: Proc. ISSCT Congress. (12:1996:Puerto Rico), 1965, p. 871-874.
18. Ladizinski, G.; Fainstein, R. A case genome partition in polyploid oats. *Theor. Appl. Genet.*, 1978, vol.- 51, p. 159-160.
19. Lacadena, J. R. Citogenética. Madrid : Ed. Complutense, 1996. 931 p.

Recibido: 10 de septiembre del 2001

Aceptado: 11 de enero del 2002