

# EL AHIJAMIENTO *In Vitro* EN PRESENCIA DE FILTRADOS DE *U. scitaminea* Sydow COMO CRITERIO PARA LA RESISTENCIA AL CARBÓN DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR

E. Héctor, María M. Hernández y Raisa Rodríguez

**ABSTRACT.** The smut resistance trials of new varieties play an essential role in the Cuban sugar cane breeding program. At present, these studies are area, resource and time consuming, and their results depend to a great extent on genotype x environment interaction. In this paper, the results of applying *U. scitaminea* Sydow culture filtrates to *in vitro* micropropagated plantlets are reported, as a possible resistance trial to smut under laboratory conditions. The fungus culture filtrate (FCF) provoked significant variations of fresh weight, increase in length and percent of chlorotic area, of the treated seedlings independently of field resistance from plantlet varieties. On the other hand, the decrease of *in vitro* tillering induced by FCF was directly related to field resistance in the studied genotypes. The measurement of this variable allowed to classify correctly six from the eight varieties studied, which encourages its future application as a criterion for smut resistance.

**RESUMEN.** Las pruebas para la resistencia al carbón de las nuevas variedades constituyen una parte esencial del programa de mejoramiento de la caña de azúcar en Cuba. Actualmente, estos estudios consumen una gran cantidad de tiempo, área y recursos, y sus resultados dependen en gran medida de la interacción genotipo x ambiente. En este trabajo se presentan los resultados de la aplicación de filtrados del cultivo de *U. scitaminea* Sydow a plántulas micropropagadas *in vitro*, como posible prueba de resistencia al carbón en condiciones de laboratorio. El filtrado del cultivo del hongo (FCH) provocó variaciones significativas en el peso fresco, incremento de la longitud y porcentaje de área clorótica de las plántulas tratadas, independientemente de la resistencia de campo de las variedades de las cuales se originaron las plántulas. En cambio, la disminución en el ahijamiento *in vitro* inducida por el FCH estuvo directamente relacionada con la resistencia en el campo de los genotipos estudiados. La medición de esta variable permitió clasificar correctamente seis de las ocho variedades estudiadas, lo que estimula su futuro empleo como criterio de resistencia al carbón.

**Keywords:** smut, sugar cane, disease resistance, tissue culture

**Palabras clave:** carbón, caña de azúcar, resistencia a la enfermedad, cultivo de tejidos

## INTRODUCCIÓN

El carbón de la caña de azúcar (*U. scitaminea* Sydow) es en la actualidad en Cuba una de las enfermedades que producen importantes pérdidas en la economía azucarera. Por lo tanto, la prueba para la resistencia al carbón de las nuevas variedades juega un papel esencial en el programa de mejoramiento.

Aunque existe una metodología para desarrollar las pruebas de resistencia (Alfonso *et al.*, 1990), se conoce que las pruebas en condiciones de campo consumen tiempo, área y recursos; además, sus resultados dependen en gran medida de la interacción genotipo x ambiente. La

posibilidad de llevar a cabo este tipo de ensayos en condiciones *in vitro* reduciría grandemente los gastos.

Recientemente se ha demostrado la expresión de la resistencia al carbón de variedades de caña de azúcar en condiciones *in vitro* (Héctor *et al.*, 1995). Los filtrados del cultivo de *U. scitaminea* Sydow se han empleado exitosamente también para la selección de somaclones resistentes a la enfermedad (Héctor *et al.*, 1993; Gómez, 1996; Héctor, 1996). Sin embargo, el uso de callos o suspensiones celulares para las pruebas de resistencia no es recomendable, pues la variación somaclonal puede alterar los resultados. La existencia en Cuba de una tecnología para la micropropagación de variedades de caña de azúcar que proporciona plantas de gran identidad y pureza genéticas brinda una herramienta para realizar dichos estudios en condiciones de laboratorio.

En este trabajo se estudió el ahijamiento de plántulas de diferentes variedades cultivadas *in vitro* con filtrados del cultivo de *U. scitaminea* Sydow, como posible prueba para la resistencia al carbón de la caña de azúcar.

E. Héctor, Profesor Asistente del Laboratorio de Biotecnología, Universidad Agraria de La Habana (UNAH), Apartado 18-19, San José de las Lajas, CP 32 700; Dra. María M. Hernández, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Ms.C. Raisa Rodríguez, Investigador Agregado, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Ciudad de La Habana, Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El filtrado del cultivo del hongo (FCH) se obtuvo según lo descrito por Héctor (1996). Las esporas de *U. scitaminea* Syd. se sembraron sobre medio papa-dextrosa-agar y se mantuvieron en la oscuridad a 30°C durante 10 días. Fragmentos del micelio resultante se sembraron en medio líquido de Murashige y Skoog (1962) libre de hormonas. Después de 15 días, alícuotas de 0.1 mL de estos cultivos se pipetearon a frascos conteniendo 50 mL de medio de Murashige y Skoog (1962) líquido sin hormonas. Luego de 24 días, el medio fue filtrado a través de papel, y el FCH se conservó congelado hasta su utilización.

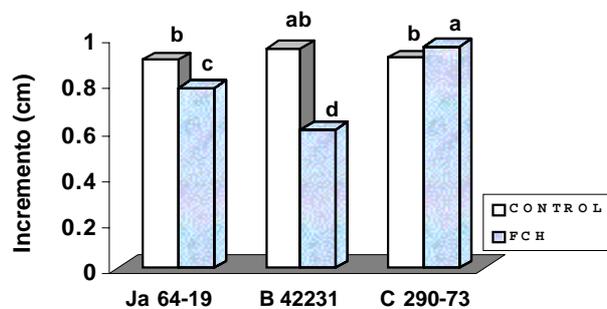
Las plántulas micropropagadas se obtuvieron según lo recomendado por Santana (1995) de las variedades Ja64-19 (altamente resistente al carbón), B42231 y C290-73 (altamente susceptibles). Las plántulas de cada variedad, en número de 30, se transfirieron a medio de propagación (control) (MP) o a medio de propagación enriquecido con 60 % de FCH (v/v) (MP + FCH). Después de cuatro semanas a 28°C bajo 3000 lux (14 horas de luz, 10 de oscuridad), se evaluó el comportamiento de las siguientes variables:

- ⇒ Incremento en la longitud de las plántulas = longitud actual - longitud al inicio del experimento
- ⇒ Cantidad de hijos por planta
- ⇒ Peso fresco
- ⇒ Porcentaje de área clorótica (considerando como 100 % el total de masa vegetal contenido en cada tubo).

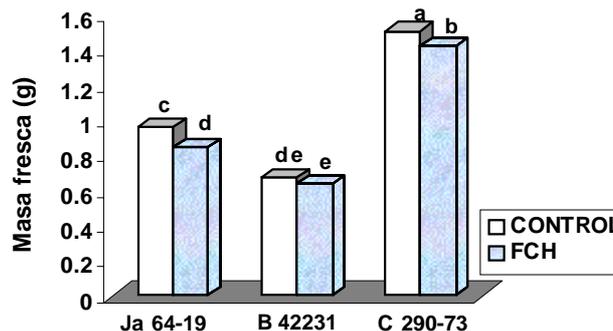
En un segundo experimento, se determinó solamente la cantidad de hijos en plántulas micropropagadas con o sin FCH de las variedades C1324-74 (susceptible al carbón), C1616-75 y CP52-43 (intermedias), C120-78 y Co997 (resistentes). Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas para el experimento anterior. El criterio para la resistencia de campo de estas variedades se obtuvo del análisis de sus resultados, en las pruebas de resistencia llevadas a cabo en las Estaciones Provinciales de Investigaciones de la caña de azúcar de Matanzas, Camagüey y Holguín. Para simplificar el estudio, se prefirió agruparlas en susceptibles (S), intermedias (I) y resistentes (R). Los datos de ambos experimentos se procesaron a través del análisis de varianza simple con diseño completamente aleatorizado. Las medias se compararon a través de la prueba de Duncan con  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El filtrado del cultivo del hongo ejerció una influencia significativa sobre el incremento en la longitud de las plántulas (Figura 1). Sin embargo, el comportamiento *in vitro* de las variedades no se correspondió con su resistencia en condiciones naturales. Ja. 64-19 (R) y B42231 (S) fueron significativamente afectadas, mientras la longitud de C290-73 (S) se incrementó en comparación con el control. De igual forma, el peso fresco de las plántulas se afectó por la aplicación del FCH, independientemente de la resistencia de campo de las variedades (Figura 2). Este comportamiento heterogéneo no permite el empleo de estas variables en estudios futuros.

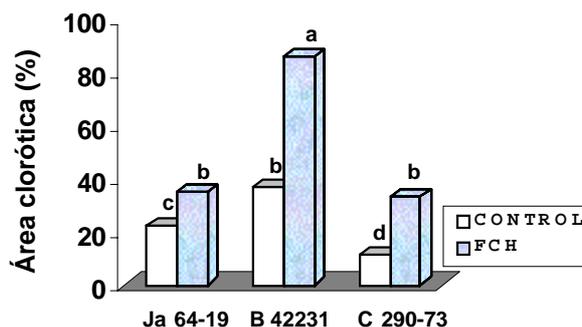


**Figura 1.** Afectaciones en el incremento en la longitud de plántulas de tres variedades después de cuatro semanas en condiciones control o con FCH (ESx=0.09)



**Figura 2.** Afectaciones en la masa fresca de plántulas de tres variedades después de cuatro semanas en condiciones control o con FCH (ESx= 0.06)

En cuanto al porcentaje de área clorótica (Figura 3), aunque la afectación fue proporcional a la resistencia de campo de los genotipos, el incremento significativo observado en la variedad Ja64-19 (R) y el hecho de que esta variable se evalúa visualmente no estimulan su empleo en futuros estudios, por las posibles confusiones que esto puede acarrear en la expresión *in vitro* de la resistencia o susceptibilidad.



**Figura 3.** Porcentajes de área clorótica de plántulas de tres variedades después de cuatro semanas en condiciones control o con FCH (ESx= 5.8)

En cambio, el FCH provocó serias disminuciones en la cantidad de hijos por plántula (con respecto al control) de las variedades susceptibles, y no afectó el ahijamiento de la resistente (Figura 4).

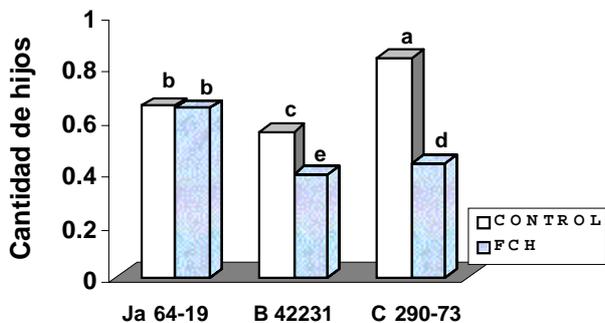


Figura 4. Afectaciones en la cantidad de hijos de plántulas de tres variedades después de cuatro semanas en condiciones control o con FCH. Datos transformados como log (y+1) (ESx= 0.08)

Héctor *et al.* (1995) demostraron la presencia de sustancias con actividad auxínica en los filtrados del cultivo del hongo. Los excesos de auxinas pueden enmascarar el efecto de otros reguladores del crecimiento, principalmente las citoquininas (Salisbury y Ross, 1994); como éstas son las principales responsables del ahijamiento en el medio de micropropagación (Santana, 1995), el exceso de auxinas aportado por el FCH pudiera ser la razón para la disminución del ahijamiento en las variedades susceptibles, al minimizar la acción de las citoquininas sobre las plantas cultivadas en presencia del filtrado. La no afectación en las variedades resistentes pudiera tener su causa en la existencia de mecanismos para controlar los excesos de auxinas (Palme y Schell, 1993).

Los resultados de este experimento condujeron a la evaluación del ahijamiento en medio de propagación (MP) o en medio de propagación enriquecido con el filtrado del cultivo del hongo (MP+FCH) de plántulas de cinco variedades con resistencia de campo conocida y diferente. El criterio para la resistencia fue:

- Ahijamiento estadísticamente similar en MP y en MP + FCH= variedad resistente
- Ahijamiento estadísticamente inferior en MP + FCH con respecto a MP= variedad susceptible

Este procedimiento (Figura 5) permitió clasificar correctamente *in vitro* a las variedades C1324-74 (S), C120-78 (R) y Co997 (R). Mientras tanto, C1616-75 y CP52-43, que se comportan como intermedias en condiciones de campo, se manifestaron *in vitro* como resistente y susceptible, respectivamente. Las contradicciones entre las pruebas de campo y de laboratorio son un evento común. Al parecer, la causa de este fenómeno radica en la existencia de varios mecanismos de defensa, como las barreras morfológicas, los inhibidores de la germinación y la protección enzimática (Héctor, 1996). Sin embargo, la resistencia *in vitro* debe estar determinada por mecanismos muy íntimos de tipo enzimático, ya que los dos primeros no pueden manifestarse en estas condiciones. Por ello, el sistema propuesto debe mostrar la resistencia más intrínseca de las variedades al tipo de alteración que induce los daños más graves a su desarrollo: las sustancias hormonales producidas por *Ustilago scitaminea* Sydow.

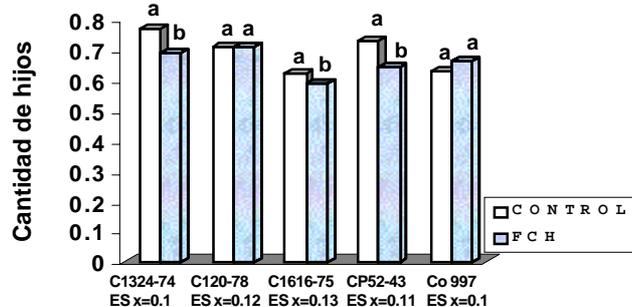


Figura 5. Afectaciones en la cantidad de hijos de plántulas de cinco variedades después de cuatro semanas en condiciones control o con FCH. Datos transformados como log (y+1)

El desarrollo de este tipo de pruebas puede ayudar a disminuir los gastos que en el presente se originan en los ensayos de campo. De la misma forma, las pruebas *in vitro* pueden ofrecer información útil sobre las variedades en la etapa de cuarentena, especialmente cuando su entrada al país se lleve a cabo en forma de propágulos cultivados *in vitro*.

## CONCLUSIONES

- Las plántulas de variedades susceptibles cultivadas en presencia de FCH mostraron sensibles disminuciones en su ahijamiento con respecto a las que crecieron en condiciones control.
- La disminución del ahijamiento en presencia de FCH puede emplearse como criterio para la resistencia *in vitro* al carbón de la caña de azúcar.

## REFERENCIAS

- Alfonso, I., *et al.* Metodología para las pruebas de resistencia al carbón, roya y mosaico en el programa de mejoramiento genético de la caña de azúcar en Cuba. Ciudad de la Habana, 1990, 35 p.
- Gómez, R. Selección *in vitro* a la enfermedad del carbón (*Ustilago scitaminea* Syd.) de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). [Tesis de Doctorado]. Santa Clara. 1996.
- Héctor, E. La resistencia *in vitro* al carbón (*Ustilago scitaminea* Sydow) y su aplicación en el mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.). [Tesis de Doctorado]. La Habana: ISCAH. 1996.
- Héctor, E., *et al.* *In vitro* selection of sugar cane smut (*U. scitaminea* Sydow) resistant somaclons. En II Molecular Cell Biology Sugarcane Workshop, Brazil. 1993.
- Héctor, E., *et al.* Experimental evidences of the presence of different smut resistance mechanisms in sugar cane. *Plant Pathol.*, 1995, vol. 2, p. 565-575.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
- Palme, K. y Schell, J. On plant regulators and their metabolites: a changing perspective. *Sem. In Cell Biol.*, 1993, vol. 4, p. 87-92.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. Fisiología Vegetal. México: Grupo Editorial de Iberoamérica, 1994, 759 p.
- Santana, I. Estudio de la variabilidad genética en poblaciones obtenidas por cultivo de tejidos [Tesis de Doctorado], Matanzas, 1995.

Recibido: 24 de marzo de 1999

Aceptado: 25 de mayo de 1999