

## Empleo de AFLP en el estudio de somaclones resistentes a la roya de la caña de azúcar

María Ileana Oloriz<sup>1\*</sup>, Luis Rojas<sup>1</sup>, Víctor Gil<sup>2</sup>, Milady Mendoza<sup>1</sup>, Ariel Arencibia<sup>3</sup>, Elva Rosa Carmona<sup>3</sup> y Elio Jiménez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara. Cuba. C.P. 54830.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias-UCLV, Santa Clara, Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

### RESUMEN

A partir del ADN genómico extraído de cinco somaclones de caña de azúcar resistentes a la roya y su donante susceptible, *Saccharum officinarum* var B 43-62, se realizaron AFLPs (amplified fragment length polymorphism) utilizando tres combinaciones de cebadores (EcoRI/aca : MseI/acc ; EcoRI/aca : MseI/atg y EcoRI/aca : MseI/agg). Fueron obtenidas seis bandas polimórficas, de las cuales dos aparecieron solamente en los genotipos resistentes, las que probablemente estén relacionadas con el carácter de resistencia a la roya. Éstos fragmentos fueron clonados, con el objetivo de determinar su secuencia nucleotídica y estudiar el papel que desempeñan dentro del mecanismo de resistencia que desarrollan estos somaclones frente a la infección por *Puccinia melanocephala*.

Palabras clave: marcadores moleculares, *Puccinia melanocephala*, *Saccharum*

### ABSTRACT

AFLPs (amplified fragment length polymorphism) was carried out from genomic DNA of five rust resistant sugar cane somaclones and their susceptible donor, *Saccharum officinarum* var B 4362, using three combinations of primers (EcoRI/aca: MseI/acc; EcoRI/aca: MseI/atg and EcoRI/aca: MseI/agg). Six polymorphic bands were obtained, two of these only appeared in the resistant genotypes, which are probably DNA sequences, related to rust resistance locus. These fragments have been cloned to study their nucleotide sequence and to investigate their roll in resistance mechanism develop by these mutants during *Puccinia melanocephala* infection.

Key words: molecular markers, *Puccinia melanocephala*, *Saccharum*

### INTRODUCCIÓN

La roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala* H. y P. Syd.) apareció en Cuba en 1978 causando pérdidas de hasta un 30% en la variedad B 4362, que en ese momento ocupaba más del 50% del área nacional cultivada (GEPLACEA, 1981). En la zafra 1980-81 esta variedad, una de las de mayor contenido azucarero que se ha cultivado en el país, fue eliminada de las áreas de producción debido a su gran susceptibilidad a esta enfermedad.

Por la persistencia del patógeno en el territorio nacional y otros países cultivadores de caña de azúcar, nuevas variedades han sido referidas como susceptibles, lo cual dificulta un adecuado manejo varietal para la producción cañera; razón que explica el empeño de los fitomejoradores en la obtención de cultivares resistentes.

Gil *et al.* (1987) obtuvieron somaclones de la variedad B 4362 resistentes a *Puccinia melanocephala* H. y P. Syd., los cuales han mantenido una alta estabilidad genética en cuanto a este carácter. En ensayos

isoenzimáticos con dichos somaclones, fue registrada una variante enzimática de peroxidasa que coincide con la encontrada en variedades resistentes a la enfermedad, la cual no existe en el donante susceptible B 4362 (Oloriz y Gil, 1994; Oloriz y Gil, 1999). Esta evidencia permite considerar que la resistencia manifestada en estos somaclones tiene un carácter puramente genético, con grandes posibilidades de ser monogénico, pues la vía de obtención de los mismos fue la mutagénesis *in vitro*, con la cual generalmente solo se alcanzan cambios genéticos puntuales (Pérez, 1998).

Con este material biológico, empleando la técnica de AFLP se inició la búsqueda de fragmentos de ADN que puedan estar relacionados con la resistencia al patógeno, con vistas a la futura obtención de plantas transgénicas de caña de azúcar resistentes a la roya.

### MATERIALES Y MÉTODOS

A partir del ADN genómico de cinco somaclones resistentes a la roya (IBP 84-15, IBP 85-18, IBP 87-17, IBP 87-19 e IBP 88-30) y su donante susceptible,

la variedad B 4362, se realizaron AFLP acorde al protocolo descrito por Vos *et al.* (1995); para lo cual los ADNs fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y MseI. Seguidamente, los fragmentos de restricción fueron ligados con los respectivos adaptadores para EcoRI y MseI, siendo sometidos posteriormente a amplificaciones selectivas por PCR; empleando las siguientes combinaciones de cebadores y bases selectivas:

- EcoRI/aca : MseI/acc
- EcoRI/aca : MseI/atg
- EcoRI/aca : MseI/agg

El producto de la amplificación, separado sobre geles de poliacrilamida al 6.5% desnaturalizante, fue visualizado mediante tinción con plata empleando un kit para estos fines comercializado por Promega (Q4132)

### Adaptadores y cebadores usados

#### I- MseI

Adaptador	5' GACGATGAGTCCTGAG 3' 3' TACTCAGGACTCAT 5'
Cebador de preamplificación	5' GATGAGTCCTGAGTAAa 3'
Cebadores de amplificación	5' GATGAGTCCTGAGTAAacc 3' 5' GATGAGTCCTGAGTAAatg 3' 5' GATGAGTCCTGAGTAAagg 3'

#### II- EcoRI

Adaptador	5' CTCGTAGACTGCGTACC 3' 3' CATCTGACGCATGGTTAA 5'
Cebador de preamplificación	5' GACTGCGTACCAATTCa 3'
Cebador de amplificación	5' GACTGCGTACCAATTCaca 3'

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con las combinaciones de cebadores empleadas fue posible encontrar un total de seis bandas polimórficas (Tabla 1). La No. 1 (no mostrada en el texto) y la No. 2 (Figura 1) se corresponden con secuencias nucleotídicas presentes en todos los somaclones (resistentes a la roya) y no en la variedad donante B 4362 (susceptible a la enfermedad). Sin embargo, las bandas No.3 (Figura 1), 4 y 5 (Figura 2) pertenecen a secuencias de ADN amplificadas exclusivamente en la variedad B 4362, mientras que la banda No. 6 (Figura 1) no fue amplificada únicamente en el somaclón IBP 84-15.

Las diferencias observadas en los ADNs genómicos mediante los AFLP realizados, posibilitó localizar fragmentos de ADN (bandas uno y dos) que supuestamente están relacionadas con la resistencia a la roya que presentan estos genotipos; pues a pesar

de provenir todos de un donante común, entre ellos existen grandes diferencias anatómicas, morfológicas y fisiológicas que caracterizan a cada uno (Gil *et al.*, 2001), quedando como elemento común entre ellos el de la resistencia a *P. melanocephala*. Al respecto, es importante mencionar los resultados alcanzados por Daugrois *et al.* (1996), quienes refirieron una posible herencia monogénica del carácter de resistencia a la roya en progenies del cultivar R570, encontrando una segregación 3 (resistentes): 1 (susceptibles), lo que indica una probable existencia de un gen dominante para este carácter.

Los fragmentos de ADN correspondientes a las bandas número uno y dos fueron clonados, con el objetivo de determinar su secuencia nucleotídica e investigar el papel que desempeñan dentro del mecanismo de resistencia que desarrollan estos somaclones frente a la infección por la roya de la caña de azúcar.

Tabla 1. Bandas polimórficas encontradas por combinación de cebadores empleadas para las reacciones de AFLP en caña de azúcar.

Combinaciones de cebadores	Cantidad de bandas polimórf.	Identificación de las bandas
EcoRI / aca : MseI / atg	3	2, 3 y 6
EcoRI / aca : MseI / agg	2	4 y 5
EcoRI / aca : MseI / acc	1	1
Total	6	-----

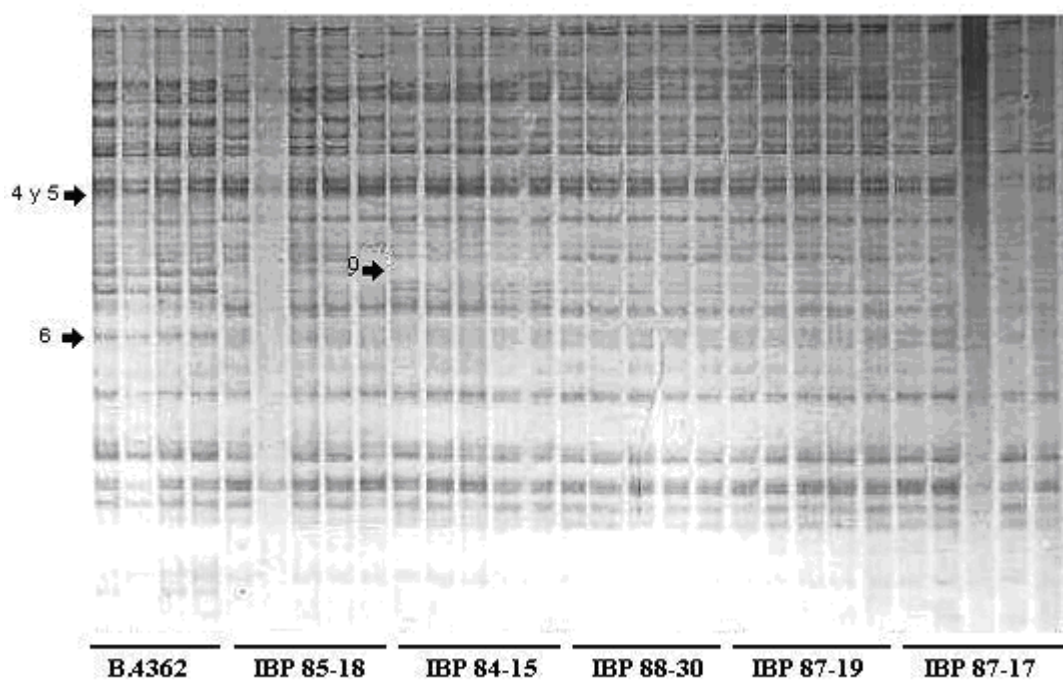


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida del producto de la reacción de AFLP empleando la combinación de cebadores Eco RI/aca: Mse I/atg.

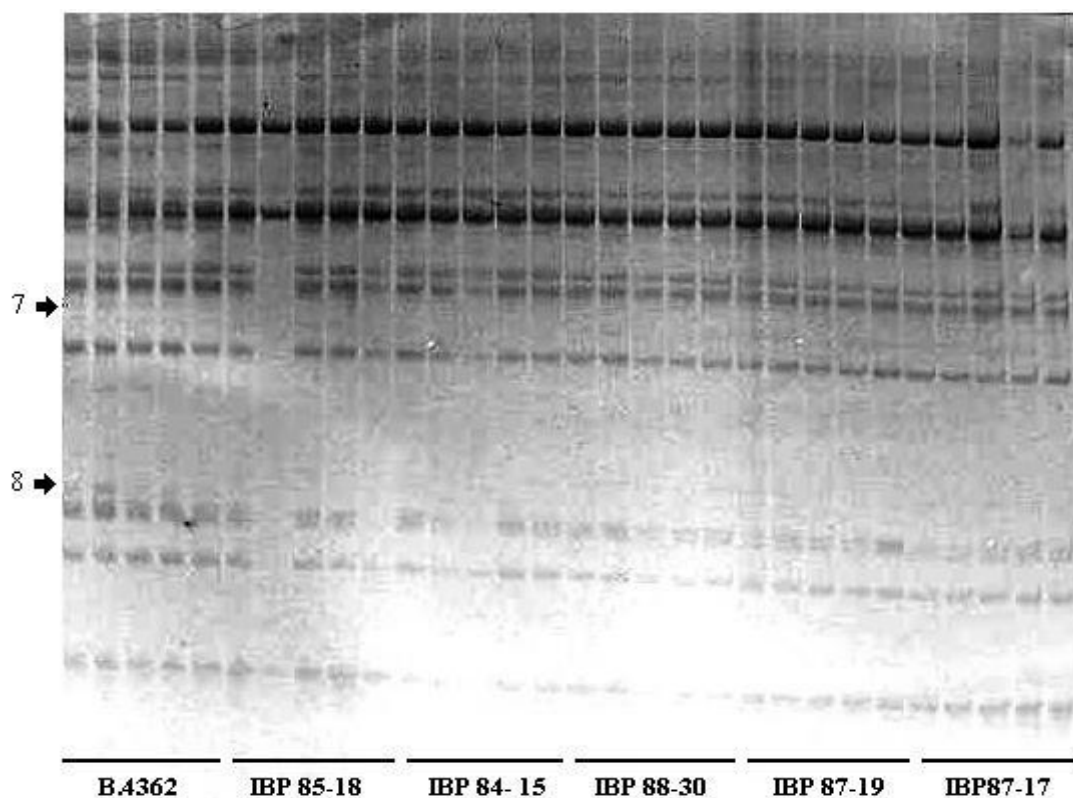


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida del producto de la reacción de AFLP empleando la combinación de cebadores Eco RI/aca: Mse I/agg.

## REFERENCIAS

Daugrois, J H, Grivet L, Roques D, Hoarau J Y, Lombard H, Glaszmann J C, D'Hont A (1996) A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar R570. *Theor. Appl. Genet.* 92: 1059-1064

GEPLACEA (1981). La Roya de la caña de azúcar (*Puccinia* spp). En reunión de Expertos de Alto Nivel sobre la prevención y control de las enfermedades del carbón y la Roya de la caña de azúcar. (Documento Básico de Referencia). La Habana 31 de Marzo – 3 Abril. (s.l) (s.n), p 50-68.

Gil V, Pérez J N, Orellana P, Mollineda P, Gonzáles A, Velasco O (1987) Mejoramiento de la variedad B 4362 ante la enfermedad

de la roya de la caña de azúcar ( *Puccinia melanocephala* Syd.) mediante el cultivo *in vitro*. VIII Congreso Latinoamericano de Genética. La Habana. Libro de reportes cortos.

Gil V, Oloriz M I, Rojas L, Mas L (2001) Estudio de las variaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas en somaclones resistentes a la roya de la caña de azúcar, provenientes de la variedad B4362. Primera Conferencia Internacional Sobre

Desarrollo Agropecuario y Sostenibilidad AGROCENTRO. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba; noviembre del 2001. Publicación en soporte digital (CD) de artículos completos, ISBN: 959-250-002-9

Oloriz M I y Gil V (1999) Marcadores moleculares en clones de caña de azúcar con resistencia a la roya. Centro Agrícola Año 26, No 4: 55-60