

## Evaluación de la variabilidad fenotípica y selección temprana a roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala* H. & P. Syd) en plantas regeneradas a partir de callos irradiados de la variedad de caña de azúcar 'SP 70-1284'

Apolonio Valdez Balero<sup>1\*</sup> y Pedro Orellana Pérez<sup>2</sup>; Novisel Veitía Rodríguez<sup>2</sup>; Lourdes García Rodríguez<sup>2</sup>; Idalmis Bermudéz Carabaloso<sup>2</sup>; Damaris Torres Rodríguez<sup>2</sup> y Yenny Padrón Montesinos<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco. México e-mail apoloniobv@colpos.mx y apolonio@colpos.mx

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

### RESUMEN

Se evaluó la variabilidad fenotípica en fases tempranas de selección en plantas regeneradas a partir del tratamiento mutagénico con dosis de 30 Gy de radiaciones Gamma (fuente <sup>60</sup>Co) aplicadas a callos en crecimiento del donante 'SP 70-1284' susceptible a la enfermedad de la roya de la caña de azúcar *Puccinia melanocephala*. Los principales cambios consistieron en la altura de las plantas obtenidas *in vitro*, el color del tallo, el hábito de crecimiento, ancho y largo de la hoja, así como en la afectación por la roya. Se observó un 14.28% de los cambios fenotípicos totales en plantín, y en el rebrote la plantas presentaron un 10.99% de cambios fenotípicos totales. En la multiplicación vegetativa uno (MV<sub>1</sub>) se seleccionaron tres posibles mutantes con menor afectación frente a la enfermedad de la roya de la caña de azúcar, para éste carácter de resistencia hacia la enfermedad de la roya la eficiencia del cultivo de tejidos y la inducción de mutaciones con la dosis de 30 Gy fue de un mutante por cada 1 525 plantas evaluadas en fase temprana de selección.

Palabras clave: variación fenotípica, selección temprana, mutagénesis.

### ABSTRACT

It was evaluated the variability fenotipic in early phases of selection from plants regenerated of the mutagenic treatment with dose of 30 Gy of radiations Gamma (source <sup>60</sup>Co) applicated to calluses in growth of the donating 'SP 70-1284' tolerant to the rust disease of the sugarcane *Puccinia melanocephala*. The main changes the plants obtained *in vitro*, consisted in the height, the color, habit of growth, length and width of the leaf, as well as in the affectation for the rust disease. 14.28% of the changes all fenotipic was observed in plantín, and in the shoot the plants presented 10.99% of changes all fenotipic. In the vegetative multiplication one (MV<sub>1</sub>) three possible mutants were selected with smaller affectation in front rust disease of the sugarcane, resistance character to the rust disease efficiency of the tissue culture and the mutations induction with the dose of 30 Gy were of a mutant for each 1 525 plants evaluated in early phase of selection.

Key words: variation fenotipic, selection early, mutagenesis

### INTRODUCCIÓN

En el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp híbridos), una de las formas para inducir variabilidad es a través del uso combinado del cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro*. El cultivo *in vitro* puede sobreponer algunas limitaciones en la aplicación de esta técnica y en combinación puede acelerar los programas de mejoramiento genético desde la generación de la variabilidad hasta la selección de los genotipos deseados (Pérez, 1998; Mluszynsky *et al.*, 1995). Las mutaciones inducidas son capaces de cambiar uno o pocos caracteres sin alterar las características únicas del cultivar deseado (Novak, 1991, 1992; Van Den Bulk, 1991; Phillips, 1994; Mark *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995; Larkin, 1998 y Van Harten, 1998).

Con el objetivo de evaluar las alteraciones fenotípicas en etapas tempranas de selección y la respuesta de plantas hacia la enfermedad de la roya de la caña de azúcar, obtenidas con el uso combinado del cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro* a partir del donante 'SP 70-1284'.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se aplicó el tratamiento mutagénico con dosis de 30 Gy a 1 000 callos organogénicos provenientes de un cuarto subcultivo, obtenidos a partir de la variedad de caña de azúcar donante 'SP 70-1284'. Posterior al tratamiento mutagénico los callos fueron subcultivados en cuatro ocasiones en medio de cultivo propuesto por Heinz y Mee (1969) adicionado con 3 mg.l<sup>-1</sup> de ácido

diclorofenociácetico (2,4-D) en condiciones de oscuridad a  $28 \pm 2$  °C con el objetivo de promover su recuperación. Para la regeneración, los callos fueron colocados en medio de cultivo recomendado por Payan *et al.* (1977) sin auxina en condiciones de luz solar. Se obtuvieron 5 000 plantas, las cuales fueron aclimatizadas y posteriormente plantadas en los canteros del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) para su evaluación *ex vitro*, como control se utilizaron plantas provenientes de estacas de la variedad 'SP 70-1284' plantadas en canteros del IBP.

### Evaluación en cantero

La población de plantas se plantaron en canteros construidos con paredes de concreto que contenían sustrato compuesto por suelo negro 70% y 30% de compost (cachaza descompuesta derivada de caña de azúcar), la distancia de siembra fue de 10 cm entre plantas. Durante el desarrollo en cantero las plantas recibieron riego a capacidad de campo mediante microaspersión. Se aplicó en siembra fertilizante de la fórmula 16-6-16 a razón de 160 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno, 60 kg ha<sup>-1</sup> de fósforo y 160 kg ha<sup>-1</sup> de potasio.

Las plantas fueron evaluadas en plantín, rebrote y en la multiplicación vegetativa uno (MV<sub>1</sub>). Se evaluaron algunas características fenotípicas en plantín y en rebrote como:

- altura de la planta (cm), considerando al tallo desde la base hasta último collar visible, para la clasificación se tomaron las plantas fuera de la media ( $\pm$ ) como las que mostraron cambios;
- color de tallo, para evaluar el color de tallo se consideró al total de la población y se contabilizaron los individuos

que presentaron cambio en esta característica comparadas con el donante ('SP 70-1284');

- hábito de crecimiento, los tallos se calificaron de acuerdo con el ángulo que los mismos guardaban con la vertical, el hábito de crecimiento del donante es erecto, por lo que se consideraron fuera de tipo a los individuos que mostraron hábito de crecimiento inclinado (hasta 45°) y acamado (más de 45°);

- ancho y largo de la hoja (cm) para el ancho de la hoja consideró la media de la población, tomando las plantas fuera de la media ( $\pm$ ) como las que mostraron cambios, para el largo de la hoja se consideró a la media de la población, tomando las plantas fuera de la media ( $\pm$ ) como las que mostraron cambios;

- afectación por roya, la selección para la enfermedad de la roya en plantín se realizó a los 90 días después de plantadas y en el rebrote a los 90 días después de haber emergido, bajo condiciones de infección natural. En la evaluación se consideró el grado de afectación en el donante y se seleccionaron plantas que mostraron menor afectación por la roya. La escala que se utilizó para la selección a roya en cantero fue la recomendada por Sandoval (2001) (Tabla 1).

Los mutantes seleccionados en plantín fueron sembrados en la multiplicación vegetativa uno (MV<sub>1</sub>) en los canteros del IBP, con el objetivo de evaluar la afectación por roya.

Se determinó la tasa de variabilidad, el porcentaje que representó cada variación fenotípica observada y las frecuencias de aparición respecto al total de las plantas evaluadas. Los datos se analizaron estadísticamente por la prueba de Chi-cuadrada utilizando el paquete de programas STATGRAFICS Ver . 4.1 sobre Windows.

Tabla 1. Escala de evaluación para la afectación por la roya de la caña de azúcar, según Sandoval (2001).

Grado	Reacción	Características
0	Inmune	Sin síntomas
1	Resistente	Puntos cloróticos ó necróticos
2	Moderadamente Resistente	Pústulas pequeñas hasta 0.5 x 0.5 mm. rodeadas de áreas necróticas
3	Susceptible	Pústulas de 0.5-1.0 x 0.5-1.0 mm. en islas verdes, rodeadas de color amarillo
4	Altamente susceptible	Pústulas entre 1-2 x 0.5-2.0 mm. abundantes o no, con presencia de región necrótica
5	Heterogénea	Presencia de todos los tipos de pústulas abundantes en el área foliar

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación en cantero

De los 5 000 individuos sembrados en cantero sobrevivió el 91.54% en el primer ciclo (4 577) y para el segundo ciclo sobrevivió el 94.3% (4 316).

La población de plantas que fue evaluada en cantero mostró variaciones fenotípicas las cuales difirieron cuantitativa y cualitativamente, se observaron alteraciones fenotípicas en los ciclos de plantín y rebrote evaluados en cantero, las variaciones comprendieron cambios fenotípicos en altura de la planta, en color del tallo, en hábito de crecimiento, en largo y ancho de hoja y en resistencia a roya (Tabla 2).

Se obtuvo un 14.28% de los cambios fenotípicos totales para la evaluación en plantín, encontrándose que el mayor porcentaje de variación se observó para el cambio de color de tallo, con el 29.49%, el resto de las plantas (70.51%) mostraron el color de la planta donante.

En el rebrote se observó un 10.99% de cambios fenotípicos totales. El porcentaje de variación más alto correspondió al color de tallo con un 19.64%, es evidente que los cambios en la coloración de las plantas dependieron de dos factores: uno a la dosis de radiación utilizada (radiación Gamma fuente  $^{60}\text{Co}$ ),

así como por efecto del rejuvenecimiento de los tejidos tratados.

En la calificación realizada en plantín en cantero hacia la enfermedad de la roya, se seleccionaron 15 posibles mutantes con grado 3 (reacción susceptible), los cuales mostraron pústulas pequeñas de 0.5 x 0.5 mm rodeadas de áreas necróticas (Tabla 3). La selección para la enfermedad de la roya se realizó tomando en cuenta que las plantas provenían del cultivo de tejidos, las cuales según Pérez (1998a) expresan en ocasiones dos grados más de susceptibilidad a la enfermedad. El donante 'SP 70-1284' mostró grado 5 (heterogénea), de acuerdo con la escala utilizada (Sandoval, 2001), observándose abundantes pústulas y lesiones en el área foliar.

Al aplicar el mismo criterio de selección a la enfermedad de la roya, en el rebrote se seleccionaron siete individuos que mostraron grado 3, (respuesta susceptible) a roya de la caña de azúcar (Tabla 3).

Pérez (1998b) afirmó que las plantas regeneradas a partir de tratamientos mutagénicos *in vitro* al desarrollarse en el medio ambiente tienen una gran variabilidad debido al rejuvenecimiento y mayor frecuencia de cambios epigenéticos. En caña de azúcar, para poder determinar si es una verdadera mutación serán necesarias por lo menos tres multiplicaciones vegetativas.

Tabla 2. Variaciones observadas en plantas regeneradas a partir de callos de la variedad de caña de azúcar 'SP 70-1284' tratados con 30 Gy de radiaciones Gamma, en ciclos plantín y rebrote.

Tipo de variación	Plantín		Rebrote	
	No. de plantas	%	No. de plantas	%
Altura de las plantas				
superior o inferior a 100-120 $\pm$ 45 cm	570	12.45	230	5.33
Plantas con altura entre 100 -120 cm	4 007	87.55	4 086	94.67
Cambio en la coloración del tallo				
1) verde amarillento	630	13.76	361	8.36
2) verde con tintes morados	720	15.73	487	11.28
3) similar al donante	3 227	70.51	3 468	80.35
Cambio en el hábito de crecimiento				
4) inclinado (hasta 45°)	348	7.60	131	3.05
5) acamados (más de 45°)	125	2.73	-	-
6) erectos (similar al donante)	4 104	89.67	4 185	96.95
Cambio en la hoja				
7) ancho superior ó inferior a 4 $\pm$ 3 cm	353	7.71	327	7.57
8) largo superior ó inferior a 100 $\pm$ 40 cm	721	15.75	351	8.13
9) similar al donante	3 503	76.54	3 638	84.30
Resistencia a roya	15	0.33	7	0.16
Similares al donante (susceptibles)	4 562	99.67	4 309	99.84
Total de cambios	664	14.28	474	10.99

Tabla 3. Comparación de los mutantes obtenidos por mutagénesis *in vitro* a partir del donante 'SP 70-1284' para la enfermedad de la roya de la caña de azúcar y su respuesta en plantín, rebrote y MV<sub>1</sub>.

Mutante y/o Variedad	Plantín	Rebrote	MV <sub>1</sub>
mutante 1	3	3	3
mutante 2	3	3	2
mutante 3	3	3	2
mutante 4	3	3	3
mutante 5	3	3	3
mutante 6	3	3	3
mutante 7	3	3	2
SP 70-1284 (control)	5	5	4

La estimación de la variabilidad dará una medida de las posibilidades de seleccionar en poblaciones (Pérez, 1998a). Los resultados obtenidos indicaron que estas posibilidades se incrementaran en poblaciones regeneradas desde callos en crecimiento tratados con radiaciones gamma (fuente <sup>60</sup>Co), y en la selección podrá influir: la variabilidad del carácter a mejorar y la frecuencia de mutación del o los genes involucrados en este carácter, lo cual determinará el tamaño necesario de la población, para la conclusión exitosa del proceso (García, 2001).

En la evaluación realizada en la MV<sub>1</sub> en canteros del IBP sobre la afectación por roya, los mutantes 2, 3 y 7 mostraron recuperación frente a la enfermedad al compararlos con los ciclos anteriores (plantín y rebrote), los síntomas de infección fueron grado 2 (respuesta moderadamente resistente) presentando pústulas pequeñas hasta 0.5 x 0.5 mm rodeadas de áreas necróticas, así mismo el donante se observó con menor afectación por la roya (Tabla 3).

Pérez (1998b) mencionó que la susceptibilidad a la roya es mayor en plantas derivadas del cultivo *in vitro*. La misma podrá estar asociada a cambios temporales en la estructura anatómica de la hoja, fundamentalmente la cutícula que favorece el proceso de infección del patógeno. Sin embargo, luego del restablecimiento de la estructura normal de la hoja durante el crecimiento en campo, las plantas mostraron los mismos niveles de resistencia al hongo que las plantas multiplicadas por estacas. La menor incidencia de la enfermedad en la MV<sub>1</sub> pudo estar determinada por factores fisiológicos de la planta, así como por factores ambientales, debido a que la evaluación fue realizada en periodo de baja precipitación (marzo – junio).

## CONCLUSIONES

El uso combinado del cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro* (30 Gy de radiación Gamma fuente <sup>60</sup>Co aplicados a callos en crecimiento) fue efectiva para generar variabilidad, se obtuvo en plantín un 14.28%

de cambios fenotípicos totales y en el rebrote se encontró un 10.99% de cambios fenotípicos totales.

La eficiencia de la combinación del cultivo de tejidos de la variedad de caña de azúcar 'SP 70-1284' y el tratamiento mutagénico con la dosis de 30 Gy fue de un mutante por cada 1 525 plantas evaluadas en fase temprana de selección.

## AGRADECIMIENTOS

AL ANUIES-México. Por la beca otorgada para la realización de la estancia doctoral.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS-CAMPUS TABASCO-México por las facilidades brindadas para la realización del doctorado.

## REFERENCIAS

- García, L (2001) Empleo de yemas adventicias y radiaciones gamma (Co<sub>60</sub>) en la inducción de la variabilidad en banano (*Musa sp*) cv. Gran enano (AAA). Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Instituto de Biotecnología de las Plantas. 91 pp.
- Heinz D y Mee G (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop. Sci.* (9) 346-348
- Larkin, PJ (1998) Induction, en Jain SM, Brar DS y Ahloowalia BS. (Eds). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. pp 3-13. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Mark, C, Ho YW, Tan YP, Ibrahim R y Liew KW (1995) Mutation reduction by Gamma irradiation in a triploid banana Pisang Berangan. *Malaysian Jour. Sci.* (16): 77-81
- Maluszynky, M, Ahloowalia BS y Sigurbjornsson B (1995) Application of *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85: 303-315
- Novak, FJ (1991) *In vitro* mutation system for crop improvement, in Plant mutation breeding for crop improvement. Vol. 2. IAEA, pp 327-342. Vienna, Austria
- Novak, FJ (1992) *Musa* (Bananas and Plantains). En *Biotechnology of perennial fruit crops*, Hammerschlag F.A. and Litz, RE (Ed). CAB. pp 449-488. International. Wallingford, UK
- Pérez, GF, China PA, Abrantes I, Cabrera L, Carvajal O y López M (1998) Mejora de la caña de azúcar ante la alta incidencia d

enfermedades: Consecuencia de una base genética estrecha. Resumen Seminario Taller. 35 aniversario del INICA, Cuba. 14 p.

Pérez, PJ (1998a) Variación Somaclonal. En: Pérez, PJ (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. pp 105-121. IBP, Santa Clara

Pérez, PJ (1998b) Mutagénesis *in vitro*. En: Pérez JN (Ed). Propagación y mejora genética de las plantas por biotecnología. pp 229-311. IBP, Santa Clara

Phillips, RL, Kaeppler SM y Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proc. Natl. Acad. Sci. (91): 5222-5226. USA

Sandoval RI (2002) La roya de la caña de azúcar en Cuba. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.

Editorial Centro de Información y Documentación de Sanidad Vegetal. Ciudad de la Habana

Smith, MK, Hamil SD y Langhon PW (1995) *In vitro* mutation breeding for the development of banana with resistance to race 4, *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense). En: *In vitro* mutation breeding of bananas and plantains. pp 37- 44. IAEA-TECDOC- 800

Van Den Bulk, RW (1991) Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding –a review". Euphytica 56: 269-285

Van Harten, AM (1998) Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge Univ. Press. Cambridge