

## Empleo de la mutagénesis en la mejora al grosor del tallo del somaclón IBP 89-169 de caña de azúcar

Leonardo García Rodríguez\*, Pedro Orellana Pérez, Lourdes García Rodríguez, Juan N. Pérez Ponce, Novisel Veitía Rodríguez, Idalmis Bermúdez Carabaloso, Justo Clavero García y Carlos Romero Quintana. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de la Villas. Carretera a Camajuani Km, 5. ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: leogar@uclv.edu.cu

### RESUMEN

Este trabajo se realizó con el objetivo de mejorar el somaclón IBP-89-169 seleccionado como altamente resistente a la enfermedad del carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea* Syd) y proveniente de la Ja 60-5, pero imposibilitado de pasar a la producción por ser demasiado fino. Para ello se obtuvo una población de callos que fue irradiada con 15 Gy de radiaciones Gamma obteniéndose aproximadamente 10 000 plantas con variabilidad inducida. Las mismas fueron inoculadas con una suspensión conidial, aclimatizadas en una casa de cultivo y luego sembradas en campo. A los 12 meses se realizó una evaluación por zonas en el campo para estudiar el efecto del ambiente en la variabilidad expresada comprobándose que era pequeño. Posteriormente se seleccionaron 12 individuos con valores superiores a los 20.0 mm de diámetro de los tallos, con los cuales se desarrolló un estudio clonal de donde resultaron los somaclones 0114, 0251 y 3639 con valores superiores a la variedad a mejorar (Ja 60-5) en cuanto al grosor de los tallos a la respuesta a la enfermedad.

Palabras clave: *Saccharum officinarum*, selección, *Ustilago scitaminea* Syd

### ABSTRACT

The present work was realized with the aim to improve the somaclon IBP 89-169 selected as highly resistant to the smut of the sugarcane (*Ustilago scitaminea* Syd) and procedent of the variety Ja 60-5, but imposibilitated to the production for to be too much thin. Calli were irradiated with 15 Gy of radiations Gamma obtaining 10 000 individuals, these plants were inoculated with a conidial suspension and were planted to field conditions, the selection was developed twelve months later. One evaluation in five zones of the population was realized before to selection to study the enviroment effect in the variability expresed, this evaluation showed a quite small effect. Twelve individuals with superior values to the 20.0 mm of diemeter of the stem were selected; in the clonal study were obtained three somaclons (IBP 01-14, IBP 02-51 e IBP 36-39) with better tolerance to (*U. scitamineae* Syd) and girth of the stem than the variety to improve (Ja 60-5).

Key words: *Saccharum officinarum*, selection, *Ustilago scitaminea* Syd

### INTRODUCCIÓN

La combinación del cultivo de tejidos y la inducción de mutaciones (mutagénesis *in vitro*) ha sido utilizada y estudiada por varios autores en función del mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido) (Castillo Muñoz, 1989; Lu, 1990; Imitiaz, 1998).

La variedad Ja 60-5, ampliamente distribuida en Cuba, ha tenido que ser reducida en el área sembrada debido a su elevada susceptibilidad al Carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea* Syd). Esta enfermedad es potencialmente muy severa y puede resultar en la pérdida total de los tallos molibles en las variedades susceptibles (Schenck, 1998). El somaclón IBP 89-169, proveniente de la variedad Ja 60-5, se clasificó como altamente resistente a esta enfermedad en las pruebas estatales, el mismo fue obtenido mediante un programa de mejoramiento con el empleo de la biotecnología combinada con la mutagénesis y la

selección *in vitro* de callos organogénicos con el cultivo filtrado del patógeno en trabajos desarrollados por Gómez (1996) y fue imposibilitado de pasar a la producción por presentar tallos muy finos. Partiendo de este genotipo (IBP 89-169) y con el objetivo de obtener somaclones con un grosor de los tallos similar o superior al de la Ja 60-5 pero con mayor tolerancia o resistencia al carbón es que se decidió la realización de este trabajo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Obtención del material vegetal con variabilidad

Para la obtención de los callos se partió de plantas de campo con seis meses de edad aproximadamente del genotipo IBP 89-169. Después de ser reducidos hasta la hoja +1 según clasificación de Van Dillewijn (1962), estos explantes fueron desinfectados con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 3% durante 15 minutos y

enjuagados con agua destilada estéril tres veces. Ya en la cabina de flujo laminar se eliminaron las hojas 0, - 1, - 2, y el último entrenudo y se seccionaron hasta alcanzar explantes de 5 a 10 mm de largo que fueron colocados en el medio de cultivo propuesto por Payan *et al.* (1977) suplementado con 5 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y solidificado con agar (8 g.l<sup>-1</sup>). Las condiciones de cultivo fueron de oscuridad y temperatura de 28±2 °C. A los 21 días se extrajeron los callos formados y se transfirieron al medio de cultivo propuesto por Heinz y Mee (1969) suplementado con 5 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y solidificado con agar (8 g.l<sup>-1</sup>), donde fueron subcultivados cada 21 días dos veces en las mismas condiciones de oscuridad y temperatura. La población de callos obtenida fue irradiada con rayos Gamma en una fuente de Co<sup>60</sup> utilizando una dosis de 15 Gy y posteriormente fue colocada en el medio de cultivo propuesto por Payan *et al.* (1977) suprimiendo el 2,4-D y se incubaron en condiciones de luz solar (intensidad entre 48-62.5 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) y temperatura de 26±2 °C. A los 30 días se extrajeron las plantas regeneradas de estos callos y se colocaron primero en un medio de cultivo de crecimiento (MS modificado por Jiménez, 1995) y luego se pasaron al medio de cultivo de enraizamiento (MS modificado por Jiménez, 1995). Después de tres semanas, cuando ya se habían formado las primeras raíces, se sumergieron 10 000 vitroplantas en una solución de esporas de *Ustilago scitaminea* Syd, provenientes de látigos jóvenes de la variedad Ja 60-5, empleando para ello una suspensión de 5 x 10<sup>6</sup> teliosporas por mililitro con un 98% de germinación, según el método propuesto por Orellana y Pérez (1987); y se plantaron en bandejas de polietileno utilizando un sustrato compuesto por humus de lombriz y zeolita a una proporción de 75% y 25% respectivamente, esta fase de aclimatización desarrolló en una casa de cultivo con un sistema de riego de microaspersores aéreos y una frecuencia de tres veces al día durante cinco minutos. Transcurridos 30 días, se plantaron 9 200 vitroplantas en condiciones de campo para su

posterior selección en el bloque experimental del CAI "Obdulio Carbó Serviá" perteneciente al municipio de Placetes en la provincia de Villa Clara.

### Caracterización de la población y selección de los individuos en el campo

La caracterización de la población con respecto al grosor del tallo y otros caracteres agronómicos se realizó a los 12 meses de edad. Se evaluaron 75 individuos repartidos en cinco secciones del campo. Los parámetros evaluados fueron:

- Grosor (mm)
- Longitud del tallo (cm)
- Brix refractométrico.

Teniendo en cuenta las características generales de la población, pero especialmente el grosor del tallo (diámetro superior a 20 mm) y la no afectación por enfermedades, se hizo la selección de los individuos promisorios.

### Estudio clonal con los individuos seleccionados

Con las plantas seleccionadas, se desarrolló un estudio clonal en la estación experimental "Pedro Lantigua" de Remedios en un suelo ferralítico rojo siguiendo la metodología propuesta por el INICA (1987), se evaluaron las etapas de caña planta y primer retoño.

En la etapa de caña planta las evaluaciones se realizaron en función de los caracteres grosor del tallo (mm), longitud del tallo (cm) e infección por carbón según la escala propuesta por Hutchinson (1970) (Tabla 1); mientras en el siguiente ciclo correspondiente al primer retoño solo se evaluaron dichas características para los somaclones seleccionados como promisorios en la etapa de caña planta y la variedad original (Ja 60-5).

Para los análisis estadísticos se empleó el paquete STATGRAPHICS versión 2.1.

Tabla 1. Escala de Hutchinson (1970) para la evaluación de la resistencia al Carbón de la caña de azúcar.

Escala de Hutchinson (1970)		
Grado	Nivel de Resistencia	% de tallos infectados
0	Inmune (I)	0 - 0.9
1	Muy altamente resistente (MAR)	1.0 - 2.0
2	Altamente resistente (AR)	2.1 - 3.0
3	Resistente (R)	3.1 - 5.0
4	Moderadamente resistente (MR)	5.0 - 8.0
5	Intermedio (Int)	8.0 - 11.0
6	Moderadamente susceptible (MS)	11.0 - 15.0
7	Susceptible (S)	15.0 - 22.0
8	Altamente susceptible (AS)	22.0 - 30.0
9	Muy altamente susceptible (MAS)	más 30.0

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de la población original

Cuando se analizaron los datos pertenecientes a la muestra de los 75 individuos se encontró que

no existieron diferencias significativas entre los promedios del grosor de las cinco secciones del campo y que con relación a la longitud del tallo solo una de las cinco fue inferior significativamente al resto, lo cual indica que la variabilidad ambiental en el campo fue pequeña (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento del grosor, la longitud del tallo y el brix refractométrico de 75 plantas repartidas en cinco secciones del campo de la población proveniente de callos irradiados del somaclón IBP 89-169.

Sección del campo	Grosor del tallo (mm)	Longitud del tallo (cm)	Brix (%)
1	15.9 a	173 b	21.11 a
2	17.3 a	205 a	21.49 a
3	16.9 a	204 a	20.91 a
4	16.6 a	203 a	21.48 a
5	17.1 a	198 a	21.57 a
Error Estandar	± 0.0364	± 0.0456	± 0.2427

Letras distintas en una misma columna difieren para  $p < 0.05$

Con la muestra seleccionada se establecieron los valores promedios y los intervalos de confianza para

los caracteres evaluados en la muestra de la población escogida, los mismos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Valores medios e intervalos de confianza para diferentes caracteres en la muestra de la población original de plantas irradiadas provenientes de callos irradiados del somaclón IBP 89-169.

Carácter	Valor medio	Intervalo de confianza para	
		P = 0.05	
		Inferior	Superior
Grosor del tallo	16.77± 0.32 mm	16.45 mm	17.09 mm
Longitud del tallo	197 ± 0.04 cm	193 cm	201 cm
Brix Medio	21.31 ± 0.21 %	21.10 %	21.53 %

### Selección de individuos promisorios

La selección se realizó teniendo en cuenta que las plantas provenientes del cultivo de tejidos expresan entre un 15 y un 30% de disminución en cuanto al grosor (Pérez, 1998) por lo que se tomaron los individuos que mostraron valores superiores a los 20.0mm de diámetro (19% superior al valor medio) y no presentaron síntomas de carbón. En cuanto a la longitud del tallo y el brix se tuvo en cuenta para la selección aquellos individuos con valores superiores al valor máximo del intervalo de confianza.

Al aplicar los criterios para la selección se escogieron 12 individuos que presentaron un comportamiento superior en todos los caracteres evaluados a los valores medios de la población original, con excepción del número de tallos por plantón en el cual se encontró la mayor variabilidad

incluyendo somaclones con valores inferiores a la media poblacional (MP) (Tabla 4).

Dos somaclones (IBP 01-14, IBP 02-51) presentaron los mayores valores en el grosor del tallo superando significativamente al resto. En cuanto a la longitud del tallo la mayor altura la alcanzó el somaclón (IBP 13-83), aunque todos los seleccionados presentaron valores superiores a la MP. Para el número de tallos por plantón se encontraron somaclones con valores numéricos superiores a la MP, destacándose los somaclones IBP 50-70 e IBP 50-03. Con respecto al Brix refractométrico, el somaclón (IBP 50-03) mostró un valor de 25.4%, excepcionalmente superior estadísticamente al resto. Estos resultados demuestran la variación que se creó en la población irradiada con respecto a estos caracteres cuantitativos, lo cual originó una eficiencia selectiva inicial del 0.13%, muy superior

a la reportada por Pérez (1998) con respecto al mejoramiento para la resistencia a la roya (*Puccinia melanocephala*) de 0.02%; de 0.01% para el hábito de crecimiento y de 0.04% para el contenido de azúcar, sin embargo fue inferior al reportado por el mismo autor para la reducción de la floración que fue de 0.16%.

En el estudio clonal realizado con los 12 individuos en comparación con la variedad original Ja 60-5, se obtuvieron los resultados que se muestran en

la tabla 4 para la etapa de caña planta. Se seleccionaron tres somaclones: IBP 01-14, IBP 02-51 e IBP 36-39, que presentaron valores estadísticamente superiores a Ja 60-5 en cuanto al grosor y la longitud del tallo, mientras que con respecto a la infección por el Carbón de la caña (*U. scitaminea* Syd.), se clasificaron como Muy Altamente Resistentes (MAR) de acuerdo a la escala de Hutchinson (1970); con ellos se continuó un estudio del comportamiento en la etapa de primer retoño.

Tabla 4. Valores de los caracteres evaluados en los individuos seleccionados en la población original de plantas procedentes de los callos irradiados del somaclón IBP 89-169.

Individuo	Grosor del tallo (mm)	Longitud del tallo (cm)	No. tallos por plantón	Brix %
IBP 01-14	31.0 ab	252 bcd	17	23.0 cde
IBP 02-51	33.8 a	264 b	5	23.1 cde
IBP 13-83	23.5 cd	285 a	17	22.6 de
IBP 23-09	25.4 c	223 fg	8	24.6 b
IBP 32-88	25.6 c	216 gh	14	22.4 e
IBP 32-57	26.0 c	235 def	6	23.3 c
IBP 31-32	29.4 b	255 bc	8	22.5 cde
IBP 30-34	23.0 cd	211 gh	6	22.6 de
IBP 27-15	23.4 cd	237 cdef	17	23.3 cd
IBP 36-39	25.2 c	242 efg	6	23.2 cd
IBP 50-70	20.8 d	242 cde	40	22.6 e
IBP 50-03	22.8 d	205 h	26	25.4 a
Error Estandar	±0.1014	±0.0618		±0.2313
Media de la población Total	16.77	1.97	10.8	21.31

Letras distintas en una misma columna difieren para  $p < 0.05$

En el primer retoño el comportamiento de los tres somaclones seleccionados fue estable en cuanto a los caracteres grosor y longitud del tallo, sin embargo los porcentajes de infección por carbón fueron superiores a los observados en la etapa de caña planta, no obstante, los tres somaclones evaluados superaron a la variedad Ja 60-5 en cuanto al grosor del tallo y al grado de resistencia a la enfermedad evaluada (Tabla 6).

Aunque el grosor de los tallos es un carácter determinado por complejos poligénicos y se ha planteado que estos caracteres son difíciles de mejorar a través de la mutagénesis (Pérez, 1998), en este trabajo se obtuvieron varios somaclones más gruesos que el somaclón original (IBP 89-169), pero solo cuatro, incluyendo el IBP 31-32, fueron superiores a la variedad original para este carácter. En lo referido al comportamiento para

resistencia al carbón varios somaclones se presentaron un comportamiento similar o inferior a la Ja 60-5, indicando una pérdida de la resistencia con respecto al somaclón que les dio origen (IBP 89-169).

Pérez (1998) planteó que la longitud del tallo de las plantas procedentes del cultivo de tejidos no mostró diferencias con las plantas propagadas por estacas, sin embargo, en un estudio realizado comprobó que diferentes genotipos de caña de azúcar mostraron disminuciones considerables en cuanto al peso de los tallos a causa del cultivo *in vitro* por lo que naturalmente tiene una relación directa con el grosor de los mismos, refiriendo que no todos los genotipos presentaron el mismo porcentaje de disminución del peso de los tallos, siendo de un 29.8% para el IBP 84-159 mientras que para el IBP 84-103 solo representó el 5.4%.

Tabla 5. Comportamiento en el estudio clonal de los 12 somaclones seleccionados a partir de la población original de plantas procedentes de callos irradiados del somaclón IBP 89-169.

Somaclón Variedad	Grosor Del tallo (mm)	Longitud Del tallo (cm)	Látigos de Carbón/300 tallos (% de infección)
Ja 60-5	32.0 bc	230 ab	15 (5%) (R-MR)
<b>IBP 01-14</b>	<b>35.5 abc</b>	<b>225 abc</b>	<b>3 (1%) (MAR)</b>
<b>IBP 02-51</b>	<b>37.2 ab</b>	<b>252 a</b>	<b>6 (2%) (MAR)</b>
IBP 13-83	27.6 ef	183 f	50 (16.6%) (S)
IBP 23-09	28.6 def	215 bc	3 (1%) (MAR)
IBP 32-88	25.6 fg	204 bcd	13 (4.3%) (R)
IBP 32-57	29.2 cde	245 a	7 (2.3%) (AR)
IBP 31-32	37.6 a	174 ef	28 (9.3%) (Int)
IBP 30-34	28.0 ef	182 def	4 (1.3%) (MAR)
IBP 27-15	23.0 h	130 g	20 (6.7%) (MR)
<b>IBP 36-39</b>	<b>33.0 bcd</b>	<b>227 ab</b>	<b>5 (1.7%) (MAR)</b>
IBP 50-70	21.5 g	203 bcd	17 (5.6%) (MR)
IBP 50-03	21.2 g	198 cde	6 (2%) (MAR)

Error Estandar ±0.1449 ±0.0831

Letras distintas en una misma columna difieren para  $p < 0.05$

Tabla 6. Comportamiento de los somaclones seleccionados y la variedad Ja 60-5 en la etapa de primer retoño en el estudio clonal.

Somaclón variedad	Grosor del tallo (mm)	Longitud del tallo (cm)	Látigos de carbón/300 Tallos (% de infección).
Ja 60-5	34.2	236	28 (9.3 %) (Int)
IBP 01-14	36.1	238	7 (2.3 %) (AR)
IBP 02-51	37.3	258	13 (4.3 %) (R)
IBP 36-39	34.5	232	8 (2.6 %) (AR)

## CONCLUSIONES

Los resultados indicaron la posibilidad de mejorar el grosor del tallo utilizando radiaciones gamma y combinando la selección con otros caracteres agronómicos positivos.

Se lograron seleccionar tres somaclones (IBP-0114, IBP-0251 e IBP-3639) que fueron superiores a la variedad Ja 60-5 tanto en la respuesta a la resistencia a *U. scitaminea* Syd como en el carácter grosor del tallo, con el objetivo de continuar los estudios agronómicos y epidemiológicos.

## REFERENCIAS

Castillo Muñoz A, Pérez JN y Portal R (1989) Variability induced by irradiation of calluses of the sugarcane varieties CP 5243 and MY 5450. Centro Azúcar 16: 85-91

Gómez, R (1996) Selección *in vitro* a la enfermedad Carbón (*Ustilago scitaminea* Syd.) de la caña de azúcar. Tesis de Doctorado. IBP. UCLV. -Cuba. p. 95

Heinz, DJ, Mee GWP (1969) Creating variability through callus tissue. Hawaii Sugar Plant Assoc. Exp. Stn. Annu. Rep. 4: 125-128

Hutchinson, PB (1970). A standardized rating system for recording varietal-resistance to sugarcane diseases. Sugar Cane Pathologists Newsletter 5: 24-27

Imitiaz ,K,Abdulah K, MaqboolA, Shamim S, Chulam N, Mohammad K, Nazir Dahar y Raziullah K (1998) *In vitro* mutagenesis in sugarcane, Pak.J.Bot.,30(2): 253-261

Jiménez, E (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp* híbrido). Tesis de Doctorado IBP. Universidad Central de Las Villas. Cuba. p.93

Lu YB (1990) Mutagenic effect of irradiation with  $^{60}\text{C}$  gamma rays on sugarcane callus. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica. 4: 65-70

Payan, F, Carmen O y Tascon G (1977). Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar mediante el cultivo de tejidos y yemas axilares. Acta Agronómica 27: 43- 79

Pérez, JN (1998) Mutagénesis *in vitro*. En: Pérez Ponce. JN (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. pp 297-326. IBP, Santa Clara

Schenck, S (1998) Evaluation of a PCR amplification method for detection of systemic smut infections in sugar cane.SUGAR CANE, Nº. 6

Van Dilleweijn, C (1962) Botánica de la Caña de Azúcar. Ed. Revolucionaria. Instituto del Libro, La Habana