

Identificación de clones micropropagados de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) por electroforesis de isoenzimas¹

Identification of sugarcane (*Saccharum* sp.) micropropagated clons by isoenzyme electrophoresis

A. Schugurensky² y L. Díaz³

Resumen

Para establecer un “semillero” de caña de azúcar, es necesario garantizar la pureza varietal de las plantas donantes y de la “caña semilla” obtenida por micropropagación. La identificación por caracteres morfológicos es difícil, porque son numerosos e influenciados por el ambiente. El recuento de cromosomas está sujeto a errores debido al gran número de cromosomas de pequeño tamaño y a la existencia de fenómenos de euploidía y aneuploidía. La electroforesis de isoenzimas, a partir de su polimorfismo molecular, permite confeccionar patrones de identificación varietal. El objetivo de este trabajo fue identificar clones micropropagados de caña de azúcar (RA 87-2, LCP 85-376 y LCP 85-384) y las plantas donantes, por electroforesis de isoenzimas de esterasas y peroxidadas. La electroforesis vertical se realizó en gel de poliacrilamida en un sistema de buffers discontinuo. A partir de patrones de esterasas y peroxidadas se confeccionaron dendogramas mediante el Programa de computación NTSYS versión 2.0, que cuantificaron las relaciones de parentesco de los clones analizados. El polimorfismo enzimático observado en esterasas y peroxidadas determinó la existencia de diferencias entre los clones que permitieron identificarlos. No se encontraron diferencias en los patrones enzimáticos de las plantas donantes y las micropropagadas provenientes de un mismo clon.

Palabras clave: “caña semilla”, peroxidadas, esterasas, micropropagación.

Recibido el 12-9-2000 ● Aceptado el 19-7-2001

1. Proyecto 26/A104 financiado por el Consejo de Investigaciones de la UNT (CIUNT)

2. Cátedra Genética, Fac. de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. E-Mail: musican@manant.unt.edu.ar

3. Cátedra Caña de Azúcar, Fac. de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900

4000- San Miguel de Tucumán- R. Argentina. E- Mail : ldiaz@manant.unt.edu.ar

Abstract

To establish a sugarcane "seedbed", it is necessary to guarantee the varietal purity of the donator plants and of the "seedcane" obtained by micropropagation. Identification by means of morphological characters is difficult because they are numerous and influenced by the environment. The chromosome recount is subject to errors owing to the great number of small size chromosomes and the existence of euploidy and aneuploidy phenomena. The isoenzyme electrophoresis from its molecular polymorphism, permits the realization of varietal identification patterns. The objective of this work was to identify micropropagated clones of sugarcane (RA 87-2, LCP 85-376 and LCP 85-384) and of donator plants by isoenzyme electrophoresis of esterases and peroxidases. The vertical electrophoresis was realized in polyacrylamide gel in a discontinuous buffer system. From the esterases and peroxidases patterns dendrograms were made by means of the NTSYS Computer Program, version 2.0 that quantified the analyzed clone relationships. The enzyme polymorphism observed in esterases and peroxidases determined the existence of differences among the clones that permitted identifying them. Differences were not found in the donator plant enzyme patterns and in those micripropagated from the same clone.

Key words: "seedbed", peroxidase, esterase, micropropagation, sugarcane.

Introducción

Los clones comerciales de caña de azúcar surgen del cruzamiento entre *Saccharum officinarum* y otras especies del mismo género e incluso de otros géneros, que aportan distintas características al híbrido resultante. *S. officinarum* se considera una especie octoploide con un número cromosómico $2n = 80$ y un $x = 10$ (21), por lo tanto, los clones comerciales son el producto de numerosas hibridaciones con números cromosómicos elevados ($2n = 80-120$ ó más) debido a fenómenos de euploidía y aneuploidía (3, 11, 13).

Con el fin de multiplicar caña de azúcar que será usada para el establecimiento de "semilleros" se debe partir de cañaverales de calidad, sanos y de identidad genética conocida. Por

ello, antes y después de multiplicar, es necesario seleccionar e identificar las plantas madres o donantes por sus características fenotípicas deseables que deberán corresponderse con el clon o variedad a propagar (2, 20).

Las plantas pueden ser identificadas por sus caracteres morfológicos específicos acompañados por el número de cromosomas, por marcadores genéticos (análisis de isoenzimas) y mapeo del genoma.

Las desventajas de la identificación morfológica, citada en la literatura, se debe a que toma en cuenta gran número de características botánicas difíciles de medir, se estudian en estado adulto y son influenciadas por el ambiente (12). El recuento de cromosomas está sujeto a

errores debido al gran número de cromosomas de pequeño tamaño y a la existencia de fenómenos de euploidía, aneuploidía y mosaicismo (13). Todo esto trae como consecuencia confusión en la identificación por recuento de cromosomas y por caracteres morfológicos.

Varios autores (9, 22, 23) han comunicado la posibilidad de identificar los clones de caña de azúcar por el análisis de las isoenzimas e incluso, en la mayoría de los casos, por la combinación de dos de ellas (5, 10). Esto proporciona una metodología rápida, relativamente simple y más barata que la confección de un mapa del genoma de cada clon (12).

La electroforesis de las isoenzimas sobre la base de su polimorfismo molecular hace posible la confección de patrones de identificación varietal. Los patrones proteicos se pueden considerar fenotipos electroforéticos derivados de la conformación genética de una determinada variedad. Como marcadores genéticos que son, permiten detectar contaminaciones, mezclas de clones y variabilidad

provocada por las técnicas de cultivo de tejidos, que puede o no, estar acompañada de cambios morfológicos (14). Más aún, posibilitan el análisis estadístico de la muestra corroborando las relaciones de parentesco expresadas arriba (1, 4).

La "caña semilla" disponible de cultivares importantes, a veces, es escasa en la provincia de Tucumán debido a que se incorporan al cultivo comercial, como ocurre con los importantes cultivares RA 87-2, LCP 85-376 y LCP 85-384, promisorios por su rendimiento cultural, maduración y adaptación a cosecha mecánica. Ante esta situación y para cubrir la fuerte demanda, la solución es la producción de plantas en forma masal por micropropagación, que deben ser perfectamente identificables e idénticas a la planta madre o donante (8, 16).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue identificar las plantas donantes y las obtenidas por micropropagación de tres cultivares de caña de azúcar: RA 87-2, LCP 85-376 y LCP 85-384, mediante la técnica de electroforesis de las isoenzimas esterasas y peroxidasas.

Materiales y métodos

El material de las plantas donantes provino de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC) y el de las micropropagadas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Cátedra Caña de Azúcar de la Facultad de Agronomía y Zootecnia (FAZ) de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Las electroforesis se

realizaron en la Cátedra Genética de la FAZ. La micropropagación se realizó a partir de ápices meristemáticos, que fueron incubados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (17) modificado (8, 15, 16).

Los clones estudiados son el producto de los siguientes cruzamientos:

RA 87-2: Tuc 72-16 x

desconocido

LCP 85-376: CP 77-403 x desconocido

LCP 85-384: CP 77-310 x CP 77-407

La selección se hizo sobre plantas a campo, tanto donantes como micropropagadas, de entre 3 a 9 meses de edad. Para las hojas de caña de azúcar, los patrones de las isoenzimas no cambian en este período de tiempo aún bajo diferentes condiciones de estrés fisiológico (13). Se extrajo la hoja más joven a medio desenrollar: hoja número 1 de Thom y Marezki (22) que corresponde a la hoja número - 2 de la Nomenclatura de Kuijper. Se conservaron a -15 °C, por no más de 6 meses, hasta el momento de usar.

Se maceraron, en mortero enfriado, 200 mg de la parte media del limbo de la hoja de cada una de las muestras con 1 mL de la solución de extracción. Se probaron dos tipos de soluciones de extracción:

1) 1mL de Buffer fosfato de sodio 0,1 M pH = 7 con ditiotreitól 0,01 M como agente antioxidante y 0,03 g de PVP insoluble como agente antifenólico (10).

2) 1 mL de sacarosa 20 %

Se eligió esta última por no haber diferencias significativas en las pruebas de actividad enzimática. El macerado se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. a 4 °C y se sembró el sobrenadante a razón de 40 mL por muestra. La electroforesis se llevó a cabo en gel de poliacrilamida en un sistema de buffers discontinuo (7, 19), adaptado para electroforesis vertical. En el cuadro 1 se indica la composición de los geles y de los buffers así como las condiciones y el tiempo de la

experiencia (cuadro 1).

Para el revelado de las enzimas se utilizó o-dianisidina en el caso de las peroxidasas (PRX) y a y b naftil acetato en el de las esterasas (EST) (6).

Se hicieron 17 repeticiones en cada clon tanto para la planta donante como para la micropropagada y para cada enzima porque se detectaron contaminantes en los patrones enzimáticos obtenidos de las plantas donantes.

Los patrones de ambas enzimas (zimogramas) se confeccionaron en papel milimetrado teniendo en cuenta todas las bandas tanto de la región anódica (+) en la parte inferior del gel (bandas rápidas), como de la catódica (-) en la parte superior del mismo (bandas lentas). Se le asignó el número 1 a la banda de migración anódica más rápida. Las comparaciones entre los clones se hicieron sobre la base de las variaciones de nivel de las bandas calculando sus r_f como el valor de la migración de cada banda en relación al frente de la corrida electroforética.

El análisis estadístico se realizó a través del programa de computación NTSYS versión 2.0 (18). Se confeccionaron dendogramas basados en los resultados de los patrones de EST y PRX. Para ello se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard que toma en cuenta la presencia (+) o ausencia (-) de bandas en los tres clones considerados (1). A partir de estos valores se construye una matriz de similitud y mediante el método de las medias no ponderadas, se confeccionaron los fenogramas o dendogramas relacionando las poblaciones de los tres clones. Además, se determinó la correlación cofenética (18) para representar la exactitud de la técnica utilizada.

Cuadro 1. Composición de los geles, buffers y condiciones de migración usados en electroforesis de isoenzimas de esterasas y peroxidasas.

Gel	Buffer del gel	Buffer electrodos	Voltaje intensidad duracion
Poros Grueso (2,5 cm) :	Tris-HCl	Tris : 0,00495 M	Poros Grueso: 30 mA= Cte (~ 180 V).
Acrilamida 2,5 %	0,0617 M	Glicina : 0,03836 M	Duración : 30 min
Bis-Acrilamida 0,625 %	0,75 %	pH = 8,3	
Riboflavina 5x10 ⁻⁴ %	pH = 6,7		
Sacarosa 20 %			
Poros Fino (8,5 cm):	Tris-HCl		Poros Fino: 40 mA= Cte (~200V)
Acrilamida 9%	0,375 M		Duración: 3 – 3,5 h.
Bis-Acrilamida 0,157%	4,54 %		
Persulfato de NH ₄ 0,30%	pH=8,9		

Modificada de : Feldmann, P. 1984. Analyse du polymorphisme enzymatique de la canne a sucre (*Saccharum* spp.). Utilisation pour la recherche de varabilité après culture *in vitro*. Thèse de 3^eème cycle. Développement et amélioration des végétaux. Université de Paris-Sud, Orsay.

Resultados y discusión

Así como Thom y Marezki (22), numerosos autores (10, 12, 23), han identificado clones de caña de azúcar por electroforesis de isoenzimas pero no existen referencias bibliográficas que relacionen la estabilidad genética de la planta obtenida por micropropagación y la donante. Esto es de gran importancia cuando se va a utilizar material micropropagado en la formación de "semilleros" básicos.

En este trabajo para EST (figura 1 y 2) se identificaron diez bandas para los clones RA 87-2 y LCP 85-376 y once para LCP 85-384, de las cuales, cinco (cuyos rf son 9,6, 7,6, 7,5, 7,2 y 6,8) son comunes a los tres clones. De las bandas restantes, LCP 85-376 y LCP 85-384 tienen dos comunes (rf 9,1 y 8,6), mientras que RA 87-2 no comparte ninguna con los otros dos clones.

En PRX (figura 3 y 4), se

revelaron siete bandas para RA 87-2; cinco para LCP 85-376 y cuatro para LCP 85-384, de las cuales, sólo se observó una banda común (rf 2,6) a los tres clones. De las bandas restantes, LCP 85-376 y LCP 85-384 tienen tres comunes (rf 4,4, 1,8 y 1,3).

Para ambas enzimas, las bandas comunes a los tres clones serían características del género (4, 11) y las compartidas, solo por los clones LCP 85-376 y LCP 85-384, indicarían una mayor cantidad de ancestros comunes con respecto al clon RA 87-2 (4).

Todos estos datos se cuantificaron en los dendogramas obtenidos (figura 5 y 6) que mostraron en EST y PRX, respectivamente, 33% y 10% de similitud para RA 87-2 con respecto a los otros dos clones. Para LCP 85-376 y LCP 85-384 la similitud fue 54% y 80% respectivamente.

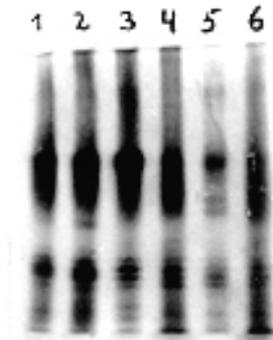


Figura 1. Electroforesis de esterases. 1 y 2 clon RA 87-2 (1: planta donante, 2: planta micropropagada). 3 y 5 clon LCP 85-384 (3: planta donante, 5: planta micropropagada). 4 y 6 clon LCP 85-376 (4: planta donante, 6: planta micropropagada).

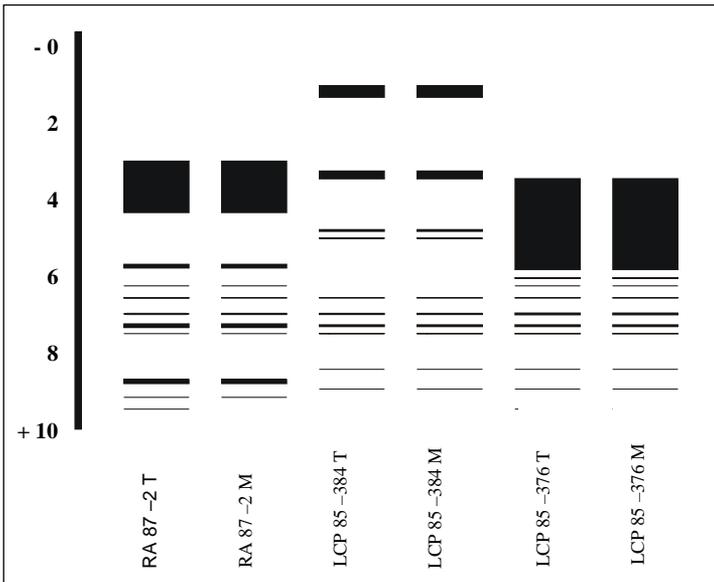


Figura 2. Zimograma de esterasas en los clones RA 87-2, LCP 85-384 y LCP 85-376 T: planta donante. M: planta micropropagada.

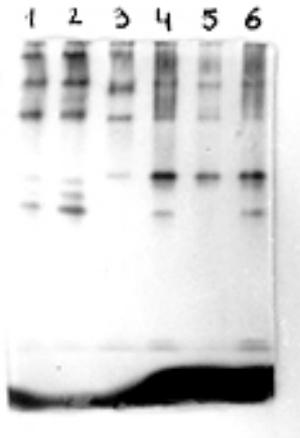


Figura 3. Electroforesis de peroxidasas 1 y 3 clon LCP 85-376 (1: planta donante, 3: planta micropropagada). 2 y 4 clon LCP 85-384 (2: planta donante, 4: planta micropropagada). 5 y 6 clon RA 87-2 (5: planta donante, 6: planta micropropagada).

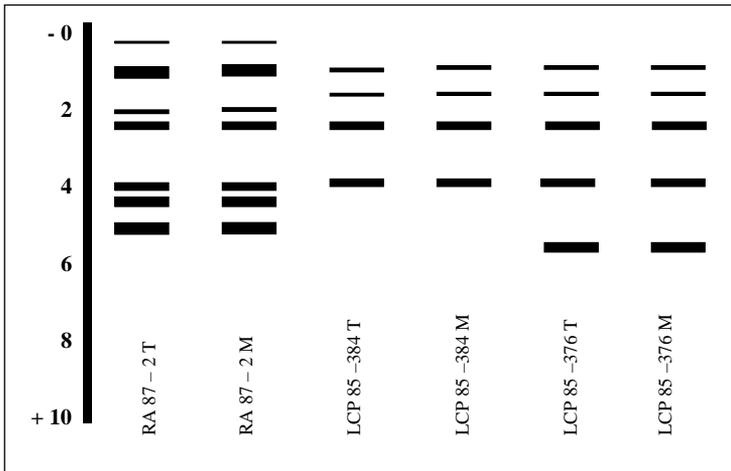


Figura 4. Zimograma de peroxidasas en los clones RA 87-2, LCP 85-384 y LCP 85-376. T: planta donante. M. planta micropropagada.

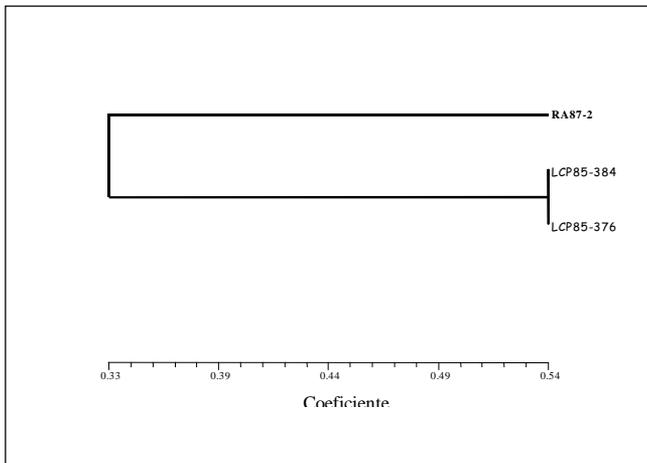


Figura 5. Dendrograma correspondiente a los clones RA 87-2, LCP 85-384 y LCP 85-376 para las isoenzimas estererasas.

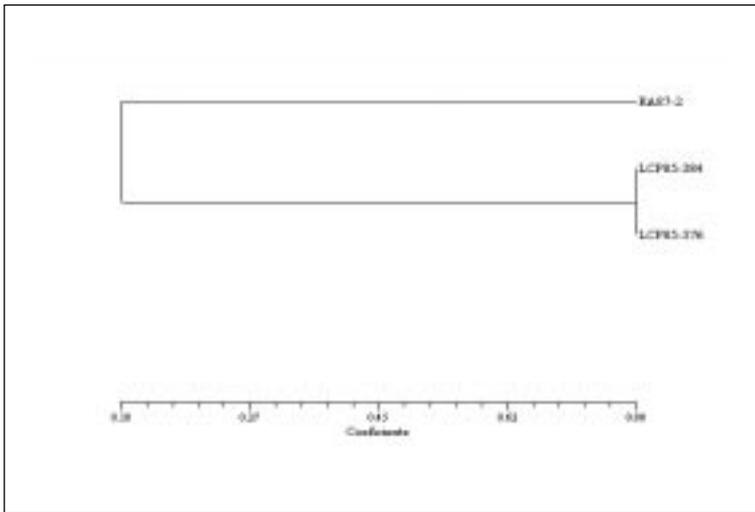


Figura 6. Dendrograma correspondiente a los clones RA 87-2, LCP 85-384 y LCP 85-376 para las isoenzimas peroxidasas.

Conclusiones

Del análisis de los resultados se concluye que, los datos aportados por electroforesis de isoenzimas de PRX y EST, pueden usarse para fijar patrones de identificación varietal, a fin de determinar la estabilidad genética del material donante y micropropagado de los tres clones de caña de azúcar estudiados.

Los dos sistemas enzimáticos analizados, marcan diferencias entre los clones que permiten identificarlos genéticamente. De un total de 17 individuos para cada clon, donante y micropropagado, no se encontraron diferencias entre ambos.

Los tres clones en estudio no

presentan progenitores comunes, sin embargo, los valores obtenidos en los dendogramas a partir de los patrones de EST y PRX, mostraron las relaciones de parentesco con los lejanos ancestros comunes.

A pesar de que las técnicas de cultivo de tejidos vegetales pueden provocar un pequeño porcentaje de variabilidad las plantas obtenidas por micropropagación, no presentaron cambios genéticos. En ese sentido, es posible garantizar la pureza varietal del material micropropagado de los clones RA 87-2, LCP 85-376 y LCP 85-384, para el establecimiento de "semilleros".

Literatura citada

1. Albany, N. J., A. Vilchez, A. Nava, M. González y C. Castro del Rincón. 1998. El análisis del conglomerado para complementar el estudio de patrones electroforéticos en *Psidium* spp. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 14: 142-152.
2. Anderlini, T. A. y S. J. Kotska. 1986. Initial yields responses of Kleentek tissue culture produced *seed cane* in Louisiana. Proceeding of the XIX ISSCT Congress. 891-892.
3. Andrada, A. B., A. P. Castagnaro, A. Nasif, y A. Pastoriza. 1991. Citogenética en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) interpretación de la fertilidad del clon progenitor SB 77-514. R. A. N. A. 26: 19-32.
4. Avise, J. C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23: 465-481.
5. Barreto, A. y J. P. Simon. 1982. Utilización de isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. Turrialba 32: 321-327.
6. Brewbaker, J., M. D. Upandhya, Y. Makinen y T. McDonald. 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III Gel electrophoretic methods and applications. Physiol. Plant. 21: 930-940.
7. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
8. Díaz, L., P. Digonzelli, E. Cerrizuela y A. M. Portas de Zamudio. 1997. Micropropagación de la variedad de caña de azúcar CP 65-357. R. A. N. A. 24: 31-41.
9. Eksomtramage, T., F. Paulet, J. L. Noyer, P. Feldmann y J. C. Glazman. 1992. Utility of isozymes in sugarcane breeding. Sugar Cane 3: 14-21.
10. Feldmann, P. 1985. Identification variétale de la canne à sucre (*Saccharum* sp.) par l'électrophorese d'isozymes. L'Agronomie Tropicale 40: 124-128.
11. Frías de Fernandez, A. M., Cristóbal de Hinojo, M. E. y M. E. Lozzia de Canelada. 1978. Citogenética de la caña de azúcar. 1. Recuentos cromosómicos de variedades cultivadas en el noroeste argentino. Lilloa 34: 23-30.
12. Gallacher, D. J., D. J. Lee y N. Berding. 1995. Use of isozyme phenotypes for rapid discrimination among sugarcane clones. Aust. J. Agric. Res. 46: 601-609.
13. Heinz, D. J. y G. W. P. Mee. 1971. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. Amer. J. Bot. 58: 257-262.
14. Heinz, D. J. 1971. New procedures for sugarcane breeders. Proc XVIth Congress ISSCT, 372-380.
15. Hendre, R., R. Iyier, M. Kotwal, S. Khuspe y A. Mascarenhas. 1983. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. Sugar Cane 1: 5-7.
16. Hendre, R. A., Mascarenhas, A. Nadgir, Meera Pathak y V. Jagamathan. 1975. Growth of mosaic virus-free sugarcane plants from apical meristem. Indian Phytopathology 28: 175-178.
17. Murashige, T. Y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
18. NTSYS-pc. 1997. Numerical taxonomy and Multivariate analysis system, version 2.0. Setauket, New York: Exeter Software.
19. Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Annual N. Y. Academy Science 121: 321-349.
20. Santana Aguilar, I., O. Nodarse Vázquez, A. Pérez Rodríguez, L. Gómez Barrios y A. Rodríguez Mansito. 1992. Estudio de la variabilidad en la micropropagación de la caña de azúcar. Cuba Azúcar 1: 10-14.

21. Stevenson, G. C. 1965. Genetic and breeding of sugarcane. Longmans, Green and Co. Ltd. London: 284 p.
22. Thom, M. y A. Marezki. 1970. Peroxidase and esterase isozymes in Hawaiian sugarcane. Hawaiian Planters' Record 58: 81-94.
23. Waldron, J. y K. T. Glasziou. 1971. Isozymes a method of varietal identification in sugarcane. Proc. ISSCT 14: 249- 256.