

Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante marcadores moleculares

María F. Perera*, María G. García*, Aldo S. Noguera*, Milena Sepúlveda Tusek*,
María P. Filippone* y Atilio P. Castagnaro*

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede producir variación somaclonal, fenómeno que consiste en modificaciones genéticas en las células y tejidos cultivados. Esto puede limitar la aplicación de dicha técnica para la micropropagación masiva, especialmente si la variación provoca un cambio fenotípico de importancia agronómica. En este trabajo se optimizó una metodología basada en la comparación de perfiles de marcadores moleculares AFLP (del inglés "Amplified Fragment Length Polymorphism"), para la detección de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar. Para la optimización de la técnica de AFLP en caña de azúcar, se utilizaron plantas de seis genotipos propagados convencionalmente y dos tipos de muestras: hojas tiernas y meristemas. La variación somaclonal fue evaluada en líneas de vitroplantas de los mismos genotipos al final del cultivo *in vitro*, luego de seis meses de micropropagación. Con las 19 combinaciones de cebadores utilizadas, se diferenciaron los perfiles moleculares de los seis genotipos. En los plantines micropropagados se detectaron perfiles diferenciales en las variedades LCP85-384 y TUCCP77-42 con 3 de las 19 combinaciones de cebadores utilizadas. Este resultado muestra la validez de la técnica para detectar variantes somaclonales, y deja en evidencia la diferencia de susceptibilidad de los genotipos al cultivo *in vitro*. Esto permitió ajustar la metodología de micropropagación para cada genotipo multiplicado y asegurar la pureza genética de cada vitroplanta.

Palabras clave: micropropagación, *Saccharum* spp., AFLP.

ABSTRACT

Evaluation of somaclonal variation in *in vitro* produced sugarcane plants through molecular markers

In vitro culture of plant tissue can produce somaclonal variation, which consists of genetic modifications in cultured cells and tissues. This may constrain the use of this technique in massive micropropagation, especially if such change causes an agronomically relevant phenotypical modification. In this work, a methodology based on the comparison of AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) molecular marker profiles was developed for detecting somaclonal variation in *in vitro* propagated sugarcane plants. To optimize AFLP technique application to sugarcane plants, six conventionally propagated genotypes and two types of samples (tender leaves and meristems) were used. Somaclonal variation was determined in micropropagated lines of these genotypes after six months of micropropagation. Molecular profile differentiation of the selected genotypes was achieved with 19 primer combinations. Differential profiles were detected in LCP85-384 and TUCCP77-42 micropropagated lines with 3 of the 19 primer combinations. This result demonstrated that the technique can be used to detect somaclonal variants and that there are different susceptibility levels to *in vitro* culture among genotypes. Therefore, micropropagation methodology was adjusted to each multiplied genotype so as to ensure genetic purity of *in vitro* propagated plants.

Key words: micropropagation, *Saccharum* spp., AFLP.

*Sección Biotecnología, EEAOC - Unidad Asociada al INSIBIO (UNT-CONICET). franciscaperera@eeaoc.org.ar

INTRODUCCIÓN

La industria azucarera es la actividad agroindustrial más antigua en la Argentina. Su producción se concentra en el noroeste del país y la provincia de Tucumán es la principal productora. Esta actividad tiene una significativa influencia en la vida socio-económica de la provincia, motivo por el cual, la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) lleva a cabo una intensa actividad de investigación y desarrollo tecnológico desde el año 1909.

Resultado de esta actividad fue la puesta en marcha del Proyecto Vitroplantas de Caña de Azúcar en el año 2001, con la finalidad de garantizar la sanidad y la pureza genética de la caña semilla. Este proyecto produce aproximadamente 55.000 plantines anuales mediante el empleo de la técnica de micropropagación *in vitro*, en combinación con el tratamiento de hidro-termoterapia y la conformación de un banco de plantas madres (o donadoras de explantos) de alta sanidad. De esta manera, se logra una rápida y eficiente multiplicación masiva de variedades comerciales y clones promisorios de caña de azúcar, aportados por el Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar (PMGCA) (Noguera *et al.*, 2003), con el objetivo de reemplazar en un futuro cercano, la totalidad de los cañaverales tucumanos con plantas de elevada productividad.

Un aspecto a tener en cuenta acerca de la multiplicación masiva de plantas mediante cultivo de tejidos, es que en ocasiones, puede inducir la aparición de eventos mutacionales como consecuencia de las nuevas condiciones ambientales, que imponen un estrés a las células sometidas a cultivo *in vitro* (Phillips *et al.*, 1994). Tales cambios fueron descritos por primera vez por Larkin y Scowcroft en 1981, siendo denominados como variación somaclonal. Si bien las causas de este fenómeno aún no están bien establecidas y, probablemente, sean muchos los mecanismos involucrados en la aparición de estas mutaciones (Vázquez, 2001), se ha determinado que la variación somaclonal está asociada a cambios en el número y la estructura de los cromosomas (traslocaciones, deleciones, duplicaciones), mutaciones puntuales, variaciones en la expresión de genes como resultado de los cambios estructurales en los cromosomas, activación de elementos transponibles, pérdida de cromatina, amplificación del ADN, o cambios en el ADN de organelas (Larkin *et al.*, 1984; Bordallo *et al.*, 2004). Estas variaciones se transmiten a las plantas regeneradas y a su progenie y afectan caracteres morfológicos, bioquímicos, de herencia simple o cuantitativa (Larkin y Scowcroft, 1981). En algunas oportunidades, tales cambios pueden tener aplicaciones útiles en el mejoramiento varietal, ya que son considerados como fuente de variación. Sin embargo, estos cambios constituyen uno de los principales inconvenientes en la micropropagación masiva de genotipos, en la

que se debe garantizar la pureza genética (Soniya *et al.*, 2001), lo que implica que el material micropropagado debe responder en un 100% al tipo genético de la variedad que se está multiplicando (Ahmed *et al.*, 2002).

Es fundamental entonces, desarrollar métodos que permitan la detección de los cambios genéticos ocasionados por el cultivo *in vitro*. En ese sentido, los marcadores moleculares pueden ser usados para caracterizar la variación somaclonal con mayor precisión que con los análisis fenotípicos y cariológicos (Cloutier y Landry, 1994). Así por ejemplo, los marcadores moleculares tales como RAPD (del inglés "Random Amplified Polymorphism DNA") o AFLP (del inglés "Amplified Fragment Length Polymorphism"), han sido utilizados con ese fin (Isabel *et al.*, 1993), aunque estos últimos presentan mayor reproducibilidad y permiten detectar mayor cantidad de polimorfismos con respecto a los RAPD.

En la técnica de AFLP, los fragmentos de ADN son amplificados empleando cebadores específicos que hibridan con adaptadores previamente ligados, sin depender del conocimiento previo de secuencias concretas, y se generan perfiles moleculares que definen inequívocamente a cada genotipo. De esta forma, la comparación de los perfiles de ADN de aquellas plantas que hayan sufrido algún tipo de alteración con el perfil de cada genotipo de partida, permite detectar variaciones genéticas de manera precoz antes de que pueda evidenciarse alguna manifestación fenotípica, como por ejemplo, un cambio morfológico o el incremento en la susceptibilidad a enfermedades.

El objetivo de este trabajo fue optimizar una metodología molecular mediante marcadores AFLP, para evaluar la variación somaclonal en los plantines micropropagados de caña de azúcar del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la optimización de la técnica de AFLP y caracterización de los perfiles moleculares de los genotipos utilizados en este trabajo, se recolectaron muestras de hojas y meristemas de cada uno de los siguientes genotipos (variedades o clones) de caña de azúcar, propagados en forma convencional: RA87-3, TUCCP77-42, LCP85-384, TUC97-7, TUC97-8 y TUC95-37, pertenecientes a la colección de germoplasma de caña de azúcar de la EEAOC, en la localidad de Las Talitas (Tucumán). Todos los genotipos utilizados en este estudio y sus progenitores se presentan en la Tabla 1.

Para el análisis de la ocurrencia de variación somaclonal en plantines obtenidos por micropropagación a partir de cultivo de meristemas, se tomaron muestras de hojas de plantines de diferentes líneas micropropagadas de las mismas variedades y clones descritos anteriormente, correspondientes a la campaña 2005 del Proyecto Vitroplantas de la EEAOC: RA87-3, líneas 29 y 30; TUCCP77-42, líneas 93

Tabla 1. Genotipos evaluados de caña de azúcar y sus progenitores.

Genotipos	Progenitores	
	Madre	Padre
LCP85-384	CP77-310	CP77-407
RA87-3	TUC75-25	CP57-614
TUCCP77-42	CP71-321	US72-019
TUC95-37	CP65-357	S87-1756
TUC97-7	LCP85-384	LCP86-454
TUC97-8	TUC87-21	TUCCP77-42

y 95; LCP85-384, líneas 109, 113 y 117; TUC95-37, líneas 46, 48, 49, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 151, 156 y 162; TUC97-8, líneas 168 y 176 y TUC97-7, líneas 6, 14 y 219. Se tomaron al azar dos plantines de cada línea, al final del ciclo de multiplicación. Las plantas de una línea se originan a partir de un mismo meristema individual, y el proceso de multiplicación *in vitro* involucra seis ciclos de multiplicación o repiques de aproximadamente un mes de duración cada uno (Noguera *et al.*, 2003).

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Aljanabi *et al.* (1999), a partir de 200 mg de material de hojas jóvenes y meristemas apicales, molido con nitrógeno líquido. La calidad de los ácidos nucleicos extraídos fue monitoreada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (UV). La cuantificación de los ácidos nucleicos extraídos se realizó mediante determinación de la densidad óptica (DO) en espectrofotómetro a 260 nm.

AFLP

La estabilidad genética de las plantas de caña de azúcar, obtenidas por cultivo *in vitro* y propagadas convencionalmente, fue examinada utilizando la técnica de AFLP.

Las secuencias de los adaptadores y los cebadores de preamplificación (ALPHA DNA) fueron idénticas a las publicadas en el procedimiento estándar de AFLP e incluyen la secuencia núcleo del adaptador, seguida de la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción (Vos *et al.*, 1995). Los cebadores de la preamplificación tienen una sola base selectiva, (Eco-A y Mse-c) y los de amplificación, dos bases selectivas adicionales (Tabla 2).

El ARN se eliminó por tratamiento con RNasa A pancreática (Promega). El ADN genómico (250 ng) fue digerido con MseI (Promega), una enzima de restricción de corte frecuente, que reconoce un sitio de cuatro pares de bases (T/TAA), combinada con la enzima EcoRI, que reconoce sitios de seis pares de bases (G/AATTC). La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 4 h. Los fragmentos de restric-

Tabla 2. Adaptadores y cebadores de AFLP utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia (5' - 3')
Eco- A1 Adaptador sentido	CTCGTAGACTGCGTACC
Eco- A2 Adaptador antisentido	AATTGGTACGCAGTCTAC
Mse-A3 Adaptador sentido	GACGATGAGTCCTGAG
Mse-A4 Adaptador antisentido	TACTCAGGACTCAT
Eco-A	GACTGCGTACCAATTCA*
Eco-1	-GG
Eco-2	-CT
Eco-3	-GC
Mse-C	GATGAGTCCTGAGTAAC*
Mse-1	-TT
Mse-2	-AT
Mse-3	-AC
Mse-4	-AA
Mse-5	-TC
Mse-6	-TA
Mse-7	-AG
Mse-8	-TG

*Secuencia núcleo de los cebadores con una base selectiva.

ción fueron ligados a los adaptadores a 20°C durante 2 h (Vos *et al.*, 1995).

Los productos de ligación fueron diluidos 10 veces en agua destilada estéril y empleados como molde en la reacción de preamplificación, utilizando los cebadores Eco-A y Mse-C. Los productos de preamplificación fueron diluidos 30 veces en agua destilada estéril y utilizados como molde para las reacciones de amplificación. Las 19 combinaciones de cebadores empleadas en la reacción de amplificación se presentan en la Tabla 3. Los parámetros del programa de amplificación de la reacción fueron los descritos por Vos *et al.* (1995) y las reacciones se realizaron en un equipo PTC-100: Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) en condiciones desnaturizantes, y visualizados por tinción con nitrato de plata.

Tabla 3. Combinaciones de cebadores utilizadas para la evaluación de la variación somaclonal.

Mse Eco	1	2	3	4	5	6	7	8
1	x	x	x	x	x	x	x	x
2	x	x	x	x	x	x	x	x
3	x	x	x					

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron transformados en matrices binarias de 0 y 1 (ausencia y presencia del marcador molecular, respectivamente). Tanto los marcadores polimórficos como los monomórficos fueron considerados en el análisis.

El análisis estadístico de los perfiles de ADN, al igual que el cálculo de las distancias genéticas y la construcción de un fenograma de similitud, se realizaron con el programa informático NTSYS (Rohlf, 1993), y como parámetro de estimación se utilizó el coeficiente de Dice (Dice, 1945). El coeficiente de Dice se calcula como $D=2C/(A+B)$, donde A es el número de bandas únicas del primer genotipo, B es el número de bandas únicas del segundo genotipo y C es el número de bandas comunes compartidas por los genotipos A y B.

Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de caña de azúcar

Antes de realizar el análisis de variación somaclonal, cada una de las muestras fue sometida al diagnóstico molecular de las principales enfermedades sistémicas de la caña de azúcar: el mosaico de la caña de azúcar, causado por los virus SCMV (del inglés *Sugarcane mosaic virus*) y SrMV (del inglés *Sorghum mosaic virus*); el raquitismo de la caña soca o RSD (del inglés "ratoon stunting disease") y la escaldadura de la hoja o LS (del inglés "leaf scald"), causadas por las bacterias *Leifsonia xyli* sp. *xyli* y *Xanthomonas albilineans*, respectivamente. Para cada una de las enfermedades se utilizaron protocolos optimizados en el Laboratorio de Biotecnología de la EEAOC. Para la detección del virus del mosaico de la caña de azúcar se empleó el protocolo de RT-PCR (del inglés "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction") descrito por Alegria *et al.* (2003), utilizando el par de cebadores SCMV F4/R3. La detección del virus del mosaico del sorgo se realizó utilizando el protocolo de RT-PCR, propuesto por Yang y Mirkov (1997), con los cebadores SrMV F3/R3. Ambos pares de cebadores amplifican un fragmento del gen de la proteína de la cápside viral de aproximadamente 900 pares de bases (pb) para SCMV y 870 pb para SrMV. El ADN contaminante presente en las muestras fue eliminado por tratamiento con DNasa. La primera hebra de ADNc fue sintetizada empleando la enzima transcriptasa reversa *Maloney-murine leukemia virus* (M-MLV, Promega) según las indicaciones del proveedor, utilizando los cebadores reversa como cebador iniciador. La reacción de PCR (20 µl de volumen final) consistió en 7,5 µl de ADNc, 250 ng de cada cebador, tampón 1 X (Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 100 µM dNTPs (Amersham), 0,6 unidades de Taq DNA polymerase (Promega) y agua tratada con DEPC (Dietil-pirocarbonato, USB) para llevar a volumen final. Los programas de amplificación utilizados fueron los siguientes: para la detección de SCMV, un ciclo de 94°C (quince minutos); 35 ciclos a 94°C (un minuto), 60°C (1 minuto) y 72°C (un minuto) y un ciclo final a 72°C durante cinco minutos. Para el SrMV: un ciclo a 94°C (quince minutos); 35 ciclos a 94°C (un minuto), 52°C (un minuto) y 72°C (dos minutos) y un ciclo

final a 2°C durante siete minutos. Las reacciones se realizaron en un equipo PTC-100: Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

Para la detección del raquitismo de la caña soca se utilizó el protocolo descrito por Pan *et al.* (1998), utilizando los cebadores Cxx1/Cxx2, que amplifican un fragmento de 438 pb. Cada reacción consistió en 1,5 U de Taq polimerasa; tampón 1; 2 mM MgCl₂; 150 µM de dNTPs; 0,4 µM de cada cebador; 2 µl de muestra y agua bidestilada estéril para completar un volumen final de 20 µl. Programa de amplificación: un ciclo a 95°C (cinco minutos); 40 ciclos a 95°C (1 s), 57°C (10 s), 72°C (30 s) y una extensión final a 72°C (cinco minutos).

En el caso de la escaldadura de la hoja, se utilizó el protocolo de Pan *et al.* (1999) y los cebadores PGBL1/PGBL2, los cuales amplifican un fragmento de 288 pb. La mezcla de reacción fue la misma que para el diagnóstico de raquitismo. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 95°C (cinco minutos), 30 ciclos a 95°C (1 s), 57°C (10 s), 72°C (30 s) y 72°C (cinco minutos).

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1,5% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador con luz UV.

RESULTADOS

Previamente al análisis por AFLP, las muestras fueron evaluadas para determinar su sanidad, y solo se tomaron aquellas que resultaron negativas para todas las enfermedades evaluadas, minimizando así la posibilidad de que bandas diferenciales puedan deberse a la amplificación de los genomas de patógenos presentes. Cabe destacar que dentro del Proyecto Vitroplantas, las líneas que resultan positivas para las enfermedades evaluadas son eliminadas, como procedimiento de rutina.

Para la optimización de la técnica de AFLP aplicada en nuestro estudio, se utilizaron seis genotipos de caña de azúcar, propagados en forma convencional. La calidad del ADN usado en esta serie de reacciones de AFLP fue apropiada, observándose un patrón general de bandas amplificadas semejante entre genotipos. Con respecto al análisis comparativo de las amplificaciones de las muestras de meristemas y de hojas tiernas, los resultados muestran que en ambos casos se obtuvieron productos idénticos de amplificación, indicando la factibilidad de uso de ambos tipos de tejidos (datos no mostrados). La posibilidad de utilizar hojas en lugar del meristema apical facilita el análisis, dado que el meristema se oxida con gran facilidad, lo cual influye en la calidad de los ácidos nucleicos. Por otro lado, en el caso de las vitroplantas, el meristema representa un tejido insuficiente para hacer el análisis.

Las 19 combinaciones de cebadores utilizadas para las reacciones de AFLP, amplificaron en el 100% de los individuos evaluados (Figura 1) y permitieron obtener los perfiles moleculares de los seis genotipos de caña de azúcar propagados convencionalmente y utilizados como controles en la evaluación de las vitroplantas. En general, en

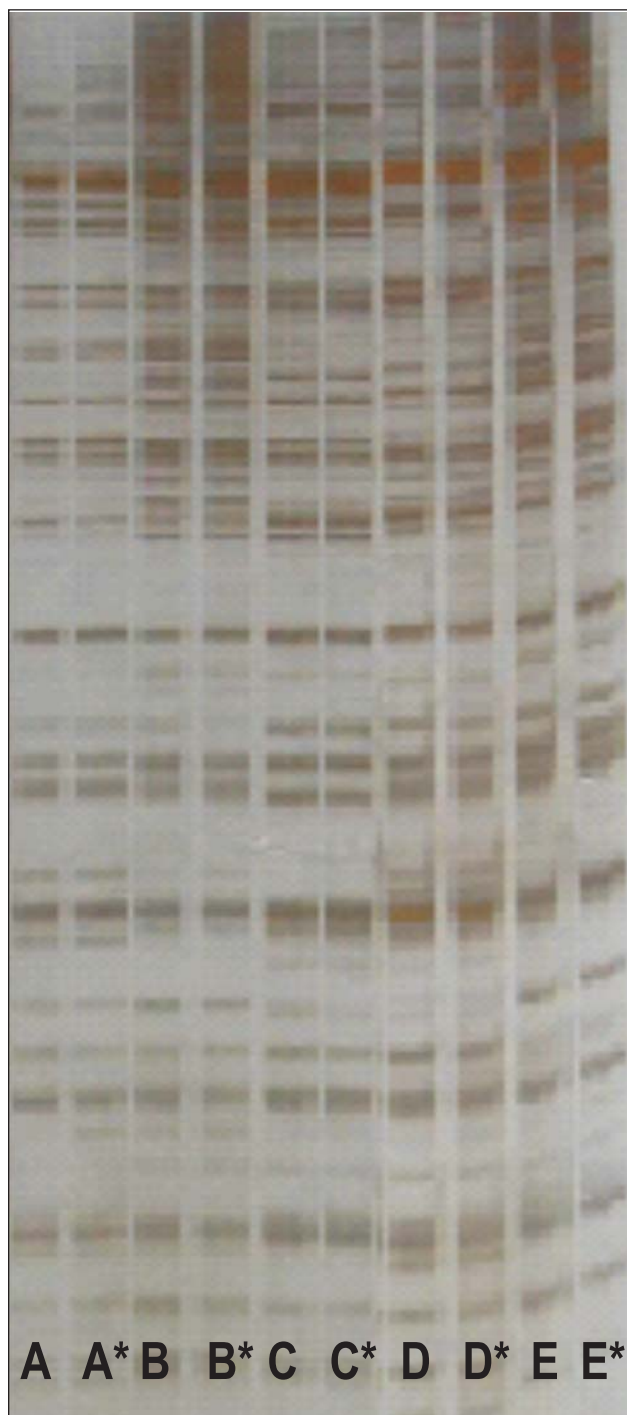


Figura 1. Perfiles moleculares AFLP de genotipos de caña de azúcar. Electroforesis en gel de poliacrilamida de productos de amplificación de los genotipos de caña de azúcar TUC97-7 (A y A*), LCP85-384 (B y B*), TUC95-37 (C y C*), RA87-3 (D y D*) y TUCCP77-42 (E y E*), utilizando la combinación de cebadores Eco AGG y Mse CTA. Cada muestra se analizó con su duplicado (*).

una reacción de AFLP se logra la amplificación de 50 a 100 fragmentos (Bassan *et al.*, 1991), aunque en este trabajo solo se consideraron aquellos marcadores de mayor inten-

sidad, los cuales dieron como resultado alrededor de 38 bandas por cada reacción de AFLP. En total se obtuvieron 723 marcadores moleculares, de los cuales 27% resultaron polimórficos. Todas las combinaciones de cebadores utilizadas permitieron detectar diferencias en los patrones de amplificación y estimar las distancias genéticas entre estos seis genotipos, lo que confirmó la utilidad de la técnica para alcanzar el objetivo planteado.

En el análisis de las líneas micropropagadas, solo dos de los genotipos en estudio presentaron perfiles diferenciales con respecto al perfil del genotipo original (control). En la variedad LCP85-384, se observó un solo producto diferencial detectado con la combinación 2 de cebadores, ausente en el control convencional y presente en las tres líneas evaluadas. La otra variedad en la cual se observaron productos de amplificación diferenciales fue TUCCP77-42. En este caso se visualizaron dos bandas, caracteres o productos de amplificación diferenciales, ausentes en sus controles convencionales (Figura 2), con las combinaciones de cebadores 4 y 15 y en las dos líneas analizadas (93 y 95). Estos perfiles variables no fueron diferentes entre sí, indicando que las modificaciones en el genoma ocurrirían en sitios "calientes" de mutación.

Si bien la presencia de tres bandas diferenciales representa un polimorfismo muy bajo, este resultado muestra la sensibilidad de la técnica para la detección de variantes somaclonales. El porcentaje de diversidad inducida (polimorfismo) resultó muy bajo para ambos genotipos, de 0,36% en la variedad TUCCP77-42 y de 0,17% en LCP85-384, en comparación a lo descrito por otros laboratorios. Por ejemplo, para un sistema de micropropagación similar al utilizado en nuestro laboratorio, Zucchi *et al.* (2002) detectaron un polimorfismo de hasta 15% con marcadores moleculares de menor sensibilidad, como RAPD, por lo que quizás estas variaciones se correspondan con una mayor sensibilidad de los genotipos al cultivo *in vitro*.

El porcentaje de similitud entre los seis genotipos, calculado mediante el coeficiente de Dice, resultó entre 0,92 y 0,99 (Figura 3), lo que indica que existe una diversidad genética bastante escasa (no superior a 8%) entre los clones y variedades estudiados. Esto podría deberse al reducido número de genotipos empleados como progenitores en los cruzamientos primarios. Con el objetivo de incorporar variabilidad genética en los caracteres agronómicos, el PMGCA de la EEAOC incorpora constantemente material del extranjero, principalmente de los EE.UU., el que, luego de una etapa cuarentenaria, se incorpora en el esquema de cruzamientos y selección. Los resultados indican que existe una base genética estrecha entre ambos programas de mejoramiento, dado que la variedad LCP85-384 (LCP: Louisiana-Canal Point) se agrupa con genotipos locales, y la mayoría de los mismos son producto de cruzamientos entre las variedades CP, LCP y US (USDA, Houma), muy próximas genéticamente (Tabla 1). Por otro lado, el análisis de similitud reveló que los plantines micropropagados con perfiles diferentes se agruparon con una



Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación de las líneas 93 y 95 y controles convencionales (C1, C2, C3) de la variedad TUCCP77-42. Las combinaciones de cebadores utilizadas son: Eco AGG y Mse CTT (1); Eco AGG y Mse CAT (2); Eco AGG y Mse CAC (3); Eco AGG y Mse CAA (4); Eco AGG y Mse CTC (5) y Eco AGG y Mse CTA (6). La flecha indica el producto de amplificación diferencial solo presente en las líneas micropropagadas, obtenido con la combinación 4 de cebadores.

similitud genética superior al 99% con los genotipos controles (propagados en forma convencional).

DISCUSIÓN

En relación a las estrategias utilizadas para evaluar

la estructura genética de las plantas derivadas del cultivo *in vitro*, la mayoría presenta limitaciones. Así por ejemplo, el análisis del cariotipo no puede revelar alteraciones en los genes o pequeños rearrreglos cromosomales. Por otro lado, los marcadores izoenzimáticos constituyen un método apropiado para detectar cambios genéticos, pero se

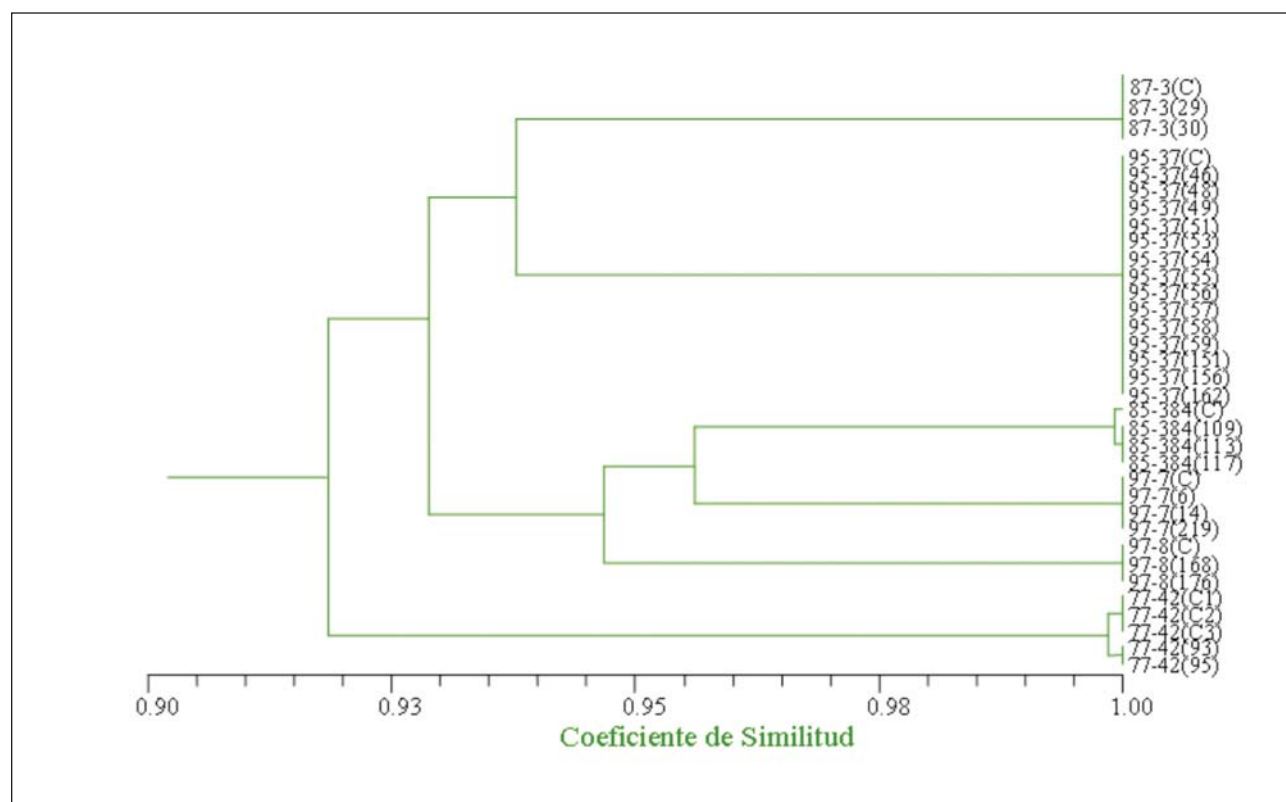


Figura 3. Fenograma obtenido a partir del análisis de las 723 bandas generadas con la técnica de AFLP, utilizando el coeficiente de Dice. Referencias: 87-3, 95-37, 85-384, 97-7, 97-8 y 77-42 corresponden a los genotipos RA87-3, TUC95-37, LCP85-384, TUC97-7, TUC97-8 y TUCCP77-42, respectivamente. C: control, propagado en forma convencional. Los números entre paréntesis corresponden a cada una de las líneas micropropagadas de cada genotipo.

encuentran limitados por el bajo número de bandas que se obtienen. Además, solo permiten visualizar indirectamente fragmentos de ADN codificantes para proteínas solubles (Bordallo *et al.*, 2004).

Los marcadores moleculares basados en PCR, tales como RAPD o AFLP, permiten detectar con una elevada sensibilidad las modificaciones a nivel del ADN. Estas técnicas posibilitan el manejo de un elevado número de muestras, requieren cantidades mínimas de material, permiten monitorear todo el genoma con un número potencialmente ilimitado de marcadores y son independientes de la interacción con el ambiente (Isabel *et al.*, 1993).

En este trabajo se obtuvieron marcadores moleculares polimórficos AFLP que permitieron la diferenciación entre los distintos genotipos analizados y entre líneas micropropagadas de un mismo genotipo, lo cual confirma la aplicabilidad de esta técnica molecular tanto para el estudio de la estabilidad genética de materiales de caña de azúcar multiplicados por cultivo *in vitro*, como para la caracterización molecular de genotipos. Se establecieron por primera vez, los perfiles moleculares de los seis genotipos estudiados y se identificaron además, marcadores moleculares específicos de cada genotipo, los cuales permitieron caracterizarlos inequívocamente.

La ocurrencia de variación somaclonal en las vitroplantas de caña de azúcar producidas en la EEAO, se determinó por comparación de los perfiles moleculares con los de los genotipos propagados en forma convencional, de tal modo que la presencia o ausencia de productos de amplificación diferentes al perfil del control puede considerarse como una alteración inducida por el cultivo de tejidos. Las tres bandas diferenciales, detectadas en los perfiles de AFLP de plantines de multiplicación *in vitro* de las variedades LCP85-384 y TUCCP77-42, indican que el cultivo *in vitro* de caña de azúcar induciría cambios en la organización genómica. Sin embargo, estas representan una tasa de variación despreciable, si se consideran los altos porcentajes de similitud genética entre los plantines micropropagados y propagados convencionalmente. Las variaciones detectadas en las líneas micropropagadas de cada genotipo resultaron idénticas, lo que indicaría la presencia de "puntos calientes" de variación, al igual que lo citado por Linacero y Vázquez (1992) y Al-Zahim *et al.* (1999) para ajo y centeno, respectivamente.

Evans y Sharp (1988) distinguieron cuatro variables críticas para la variación somaclonal: el genotipo, el origen del explanto, el período de cultivo y las condiciones del medio de cultivo. Respecto al genotipo, es posible identi-

car cultivares más susceptibles de experimentar variación somaclonal, sugiriendo la intervención de componentes genéticos. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las variedades LCP85-384 y TUCCP77-42 serían más susceptibles de sufrir modificaciones inducidas por el cultivo de tejidos que los otros genotipos evaluados.

Como se mencionó con antelación, los cambios genéticos asociados a la variación somaclonal pueden tener aplicaciones útiles en el mejoramiento varietal, como por ejemplo la selección de variedades más tolerantes a suelos con un mayor contenido de sales (Khan *et al.*, 2004). Sin embargo, estos cambios constituyen unos de los principales inconvenientes en la micropropagación, ya que se transmiten a las plantas regeneradas y afectan caracteres morfológicos, bioquímicos, de herencia simple o cuantitativa (Larkin y Scowcroft, 1981).

Por lo expuesto anteriormente, resulta esencial contar con una técnica altamente reproducible que permita detectar estos cambios. Es por ello, que a partir de los resultados de este trabajo, se incorporó la técnica de AFLP para la evaluación de la estabilidad genética de las vitroplantas producidas en la EEAOC. El número de variedades micropropagadas y de líneas producidas por variedad en el marco del Proyecto Vitroplantas, ha sido variable desde su implementación en el año 2001. Por ello, se ha evaluado un número variable de muestras de acuerdo a la cantidad total de plantines de cada línea. Las líneas en las que se detectan variaciones son eliminadas y solo continúan aquellas que responden en un 100% al genotipo original. Al mismo tiempo, mediante esta evaluación se ajustaron las condiciones del cultivo *in vitro* para cada genotipo, con el objetivo de evitar la generación de variaciones, adecuando fundamentalmente el número de multiplicaciones o subcultivos, el cual está condicionado principalmente por la tolerancia del genotipo a la exposición de los reguladores de crecimiento. Cabe resaltar que esta herramienta complementa a la rutinaria e irremplazable evaluación a campo de los caracteres fenotípicos, la cual posibilita la detección y eliminación de plantas fuera de tipo.

CONCLUSIONES

La técnica de marcadores moleculares AFLP permitió obtener productos de amplificación en la totalidad de las muestras, con todas las combinaciones de cebadores utilizadas. Los perfiles moleculares obtenidos posibilitaron caracterizar y diferenciar a cada uno de los genotipos en estudio, por lo que esta metodología puede ser utilizada para evaluar la variación somaclonal que pudiera ser inducida por el cultivo *in vitro* y, de esta manera, asegurar la pureza genética de los plantines micropropagados.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Ahmed, M. A.; E. R. Chavanne; A. S. Noguera; J. Zavaleta y J. Scandaliaris. 2002. Semillero Básico: primera

etapa de multiplicación de vitroplantas de caña de azúcar. Avance Agroind. 23 (2): 28-30.

Alegria, M.; M. Royer; M. Bousalem; M. Chatenet; J. Peterschmitt; C. Girard and P. Rott. 2003. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. Arch. Virol. 148: 357-372.

Aljanabi, S. M.; L. Forget and A. Dookun. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. Plant Mol. Biol. Report 17: 1-8.

Al-Zahim, M.; B. Ford-Lloyd and H. Newbury. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Report 18: 473-477.

Bassan, B. J.; G. Caetano-Anolles and P. M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. Annual Biochem. 196: 80-83.

Bordallo, P. N.; D. H. Silvaz; J. María; C. D. Cruzand and E. P. Fontesa. 2004. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. Hortic. Bras. 22 (2): 300-304.

Cloutier, S. and B. S. Landry. 1994. Molecular markers applied to plant tissue culture. In vitro Cell. Dev. Biol. 30: 32-39.

Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302.

Evans, D. A. and W. R. Sharp. 1988. Somaclonal and gametoclonal variation. En: Evans, D. A.; W. R. Sharp; P. V. Ammirato (eds.), Handbook of Plant Cell Culture, vol. 4. Macmillan Publishing Company, New York, pp. 97-132.

Isabel, N.; L. Tremblay; M. Michaud; F. M. Tremblay and J. Bousquet. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. Theor. Appl. Genet. 86: 81-87.

Khan, S. J.; M. Ayyaz Khan; H. K. Ahmad; R. Din Khan and Y. Zafar. 2004. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and subsequent screening for salt tolerance. Asian J. Plant Sci. 3: 330-334.

Larkin, P. J.; S. A. Ryan; R. I. S. Brettell and W. R. Scowcroft. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. Theor. Appl. Genet. 67: 443-455.

Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

Linacero, R. and A. M. Vázquez. 1992. Somatic embryogenesis in polyembryonic *Secale cereale* L. Plant Cell Rep. 12: 28.

Noguera, A.; N. Paz; E. Díaz y A. Castagnaro. 2003. L75-33 y RA89-28: dos genotipos de caña de azúcar micropropagados por la EEAOC. Avance Agroind. 24 (4): 22-24.

Pan, Y. B.; M. P. Grisham; D. M. Burner; K. E. Damann and Q. Wei. 1998. A Polymerase Chain Reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. Plant Dis. 82: 285-290.

- Pan, Y. B.; M. P. Grisham; D. M. Burner; B. L. Legendre and Q. Wei. 1999.** Development of Polymerase Chain Reaction primer highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 83: 218-222.
- Phillips, R. L.; S. M. Kaepler and P. Olhof. 1994.** Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5222-5226.
- Rohlf, F. J. 1993.** NTSYS-PC. Versión 2.0. [CD-ROM]. Applied Biostatistics Inc., Exeter Software, New York, USA.
- Soniya, E. V.; N. S. Banerjee and M. R. Das. 2001.** Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Curr. Sci.* 80 (9): 1213-1215.
- Vázquez, A. 2001.** Insight into somaclonal variation. *Plant Biosyst.* 135 (1): 57-61.
- Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijans; T. V. Lee; M. Hornes; A. Frijters; J. Pot; J. Peleman; M. Kuiper and M. Zabeau. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Yang, Z. N. and T. E. Mirkov. 1997.** Sequence and relationships of *Sugarcane mosaic* and *Sorghum mosaic virus* strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology* 87: 932-939.
- Zucchi, M. I.; H. Arizono; V. A. Morais; M. H. Pelegrinelli Fungaro and M. L. Carneiro Vieira. 2002.** Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genet. Mol. Biol.* 25 (1): 91-96.
-