

Bibliografía

Verdura T, Arnaud J, Pérez Crisité R, Tressol JC, Fleites P, Chassagne M, *et al.* Trace element status in Cuba. Relationships with Epidemic Neuropathy through SECUBA Protocol. En: Neve, *et al.*, editors. Therapeutic Uses of Trace Elements. New York: Plenum Press; 1996. p.391-4.

Fleites P, Verdura T, Pérez Crisité R, Arnaud J, Barnouin J, Chassagne M, *et al.* "SECUBA" Program. Toxic-nutritio risk and epidemic neuropathy in Cuba 1. Biological markers, antioxidant defence, disease

risk and protection factors. J Trace Elem Exp Med 1998;11:498-9.

Borrajero I, Pérez JL, Domínguez C, Chong A, Coro RM, Rodríguez H, *et al.* Epidemic neuropathy in Cuba: Morphological characterization of peripheral nerve lesion in sural nerve biopsies. J Neurol Sci 1994;127 (en prensa).

The Cuban Neuropathy Field Investigation Team. Epidemic optic neuropathy in Cuba-Clinical characterization and risk factors. N Engl J Med 1995;333: 1176-82.

Obtención de plantas transgénicas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: una nueva metodología para la transformación genética de esta gramínea

✉ Gil A Enríquez-Obregón,¹ Roberto I Vázquez-Padrón,¹ Ariel D Arencibia,¹ Dmitri Prieto-Sansonov,¹ Elva R Carmona,¹ Pilar Tellez-Rodríguez,¹ Gustavo A de la Riva,¹ Luis E Trujillo,¹ Guillermo Selman-Houssein,¹ Pedro Oramas,¹ Fidel Hernández,² Domingo Blanco,² Marlén Pérez,¹ Ariel Cruz¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 4764; E-mail: gustavo.riva@cigb.edu.cu. ²EPICA de Jovellanos, Matanzas, Cuba.

Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los cultivos más extendidos en las regiones tropicales y subtropicales. La industria azucarera y la obtención de productos químicos como el furfural, dextranas y alcohol, dependen de las zafras. Además, los subproductos del proceso de producción de azúcar representan una valiosa fuente para la alimentación animal. La ingeniería genética ha permitido obtener variedades de este cultivar con características no presentes en su fondo genético. Mediante electroporación de células intactas y biolística, se han obtenido plantas transgénicas de caña de azúcar resistentes al ataque del bórer (*Diatraea saccharalis*) [1] y al herbicida BASTA® [2], respectivamente.

Las metodologías de transformación que utilizan *Agrobacterium tumefaciens* para transferir ADN a las células vegetales, ofrecen la ventaja de transferir genes al genoma vegetal en forma limitada, con reproducibilidad y sin necesidad de utilizar equipos costosos. En este trabajo se desarrolló una metodología para introducir, de manera estable, genes foráneos en células de caña de azúcar mediante la utilización de *A. tumefaciens*. Como explantes se utilizaron meristemos y callos de la variedad comercial Ja60-5, tratados previamente con una mezcla de compuestos antioxidantes. Este tratamiento disminuyó la muerte celular, lo que mejoró la competencia del tejido vegetal y, de este modo, la frecuencia de transformación genética.

Procedimientos y Resultados

Construcción del vector binario pGT GUSBAR

Para el establecimiento de las condiciones de transformación se utilizó la cepa At 2260 transformada con el plásmido pGT GUSBAR, que porta los genes repor-

teros *uidA* (codifica la β -glucuronidasa [GUS] de *E. coli*) y *bar* (que codifica la fosfotricina-acetiltransferasa), bajo señales apropiadas para la regulación de la transcripción en plantas monocotiledóneas [3].

Evaluación del efecto de los compuestos antioxidantes sobre la necrogénesis de los explantes y callos de caña de azúcar

Para obtener explantes de caña de azúcar con índices de necrogénesis bajos en la superficie de las zonas de corte, y con una elevada competencia para ser transformados por *At*, se evaluaron tres compuestos antioxidantes: el ácido ascórbico, la cisteína y el nitrato de plata, durante el estadio de precultivación (Tabla 1). Se tomó como criterio de viabilidad celular la fracción meristemática que permaneció sin teñir frente al reactivo Evans Blue. Cada compuesto se probó en dos concentraciones diferentes de manera individual en medio líquido P+5 [4]. En todos los casos se observó una disminución en la necrogénesis del explante después de 60 h de incubación (Tabla 1).

A pesar de que la hipersensibilidad del explante disminuyó en cada tratamiento, los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó la mezcla de estos compuestos. En este caso, la necrosis en el meristemo fue inhibida hasta en 90%. Este resultado evidencia la posibilidad de sinergismo entre los antioxidantes para disminuir la respuesta de hipersensibilidad en la célula vegetal.

El efecto de los antioxidantes sobre la formación de los callos fue estudiada utilizando explantes meristemáticos. Los tratamientos AAS1, CIS1, Ag1 y AO permitieron la formación de callos amarillentos y friables con alta capacidad de regeneración, similares a los obtenidos con los explantes sin tratar (Tabla 1). Cuando se utilizaron altas concentraciones de los compuestos antioxidantes, los callos generados resultaron opacos y blandos (tipo III) con una baja capacidad de regeneración.

1. Arencibia A, Vázquez R, Prieto D, Tellez P, Carmona E, Coego A, *et al.* Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. Mol Breeding 1997;3:247-55.

2. Gallo-Meagher M, Irvine JM. Herbicide-resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. Crop Sci 1996; 36:1367-74.

3. Enríquez-Obregón GA, Vázquez Padrón RI, Prieto-Sansonov DL, Pérez M, Selman-Houssein G. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. Biotecnología Aplicada 1997; 14:169-174.

4. Enríquez-Obregón GA, Vázquez Padrón RI, Prieto-Sansonov DL, de la Riva GA, Selman-Houssein G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. Planta 1998;206:20-7.

Efecto de los compuestos antioxidantes sobre la interacción del tejido vegetal con *A. tumefaciens*

El tratamiento denominado AO fue escogido para estudiar el efecto de los antioxidantes en la transferencia de genes mediada por *At*. Como criterio para medir la eficiencia de transformación, se tomó la fracción de callos GUS-positivos y resistentes a BASTA. Igualmente, se evaluaron explantes de plantas cultivadas *in vitro* (IN) o procedentes del campo (PC) tratadas con la mezcla AO.

Ciento por ciento de los explantes infectados fueron GUS-positivos cuando a los medios de cultivo se les adicionó compuestos antioxidantes (IN1, PC1) durante la pre- y la cocultivación. En contraste con este resultado, la eficiencia de la infección fue menor cuando se utilizaron medios simples. No se detectó actividad GUS en los explantes no infectados.

Los explantes pertenecientes a los tratamientos IN1 y PC1, mostraron una tasa de formación de callos de 15% y 25%, respectivamente. La formación de callos fue muy inferior (0-13%) en el resto de las variantes. El tejido meristemático no infectado no proliferó en el medio selectivo. La presencia del ADN foráneo en los callos resistentes a BASTA fue analizada por PCR e indirectamente por un ensayo histoquímico de actividad GUS. Observamos una mejor callogénesis a partir de las plantas crecidas en condiciones de campo en comparación con las procedentes de plantas *in vitro* (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados en uva (*Vitis vinifera*) [5] para la que se observó una reducción en la necrosis de los callos y un aumento de los eventos de transformación con la utilización de varios compuestos antioxidantes.

Transformación de meristemas

Los cuatro protocolos de transformación ensayados se muestran en la Tabla 3. Los callos provenientes de los meristemas transformados fueron cortados y colocados en medio selectivo por tres meses con subcultivación cada mes, lo que permitió la obtención de callos friables con alta capacidad de regeneración.

De manera similar se infectaron callos friables, con la obtención de actividad transcritiva y proliferación celular en medios selectivos con higromicina [6]. Posteriormente, se regeneraron plantas a partir de los callos resistentes a BASTA o higromicina.

Análisis molecular y bioquímico del material transformado

Se seleccionaron tanto los callos como las plantas resistentes a BASTA que fueron GUS-positivos y mostraron la presencia del ADN foráneo en el genoma mediante Southern blot.

Tabla 1. Efecto de los tratamientos antioxidantes sobre el crecimiento de *A. tumefaciens*, la viabilidad del tejido meristemático y la calidad del callo.

Tratamientos	Compuestos antioxidantes ¹	Crecimiento de la bacteria (DO ₆₂₀) ²	Viabilidad en los explantes (%) ³	Calidad del callo ⁴
AAS1	15 mg/L ácido ascórbico	0,847	50	Tipo II
AAS2	30 mg/L ácido ascórbico	0,803	50	Tipo III
CIS1	40 mg/L cisteína	0,570	60	Tipo II
CIS2	90 mg/L cisteína	0,598	80	Tipo III
Ag1	2 mg/L nitrato de plata	0,490	70	Tipo II
Ag2	5 mg/L nitrato de plata	0,010	60	Tipo III
P+5 ⁵	Ninguno	0,600	10	Tipo II
AO	15 mg/L ácido ascórbico; 40 mg/L cisteína; 2 mg/L nitrato de plata	0,512	90	Tipo II

¹Compuestos antioxidantes ensayados en medio P+5 líquido.

²Promedio de tres experimentos independientes de determinación de DO₆₂₀ en cultivos de *A. tumefaciens* en medio YEB a 28 °C por 20 h.

³Los por cientos de viabilidad representan el promedio de diez determinaciones independientes realizadas al estereoscopio en la fracción del explante que permanece sin teñir luego de tinción con el colorante Evans Blue, versus el área total del explante.

⁴La calidad del callo fue considerada en cada caso por inspección visual y se clasificaron como:

Tipo II. Callo friable amarillo con alta capacidad de embriogénesis

Tipo III. Callo blando, blanco y opaco no embriogénico

⁵Medio P+5 sin compuestos antioxidantes usado como control negativo.

Ensayo de resistencia al herbicida BASTA en condiciones de invernadero y de campo

El crecimiento y la morfología de las plantas transgénicas fue similar con respecto a las no transformadas. Todas las plantas fueron rociadas con una dosis promedio de 2,5 g/L de BASTA. Las plantas no transformadas, así como las plantas con bajos niveles de expresión del gen *bar*, fueron afectadas seriamente. Al finalizar las pruebas bajo condiciones de invernadero, se seleccionaron 360 plantas para otras pruebas en condiciones de parcela.

5. Perl A, Lotan O, Abu-Abied M, Holand D. Establishment of an Agrobacterium-mediated system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during the grape-*Agrobacterium* interactions. *Nat Biotechnol* 1996;14:624-8.

6. Arencibia A, Carmona ER, Téllez P, Chan M-T, Yu S-M, Trujillo LE, et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* ssp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Trans Resear* 1998;7:213-22.

Tabla 2. Efecto de los compuestos antioxidantes en la transferencia génica de *A. tumefaciens* a la caña de azúcar.

Tratamientos ¹	Medio de precocultivación	Medio de cocultivación	% de explantes GUS-positivos ²	% de callos resistentes a BASTA ³	Análisis por PCR ⁴
IN 1	P-AO	P+5 AO	100	15,5 (55)	+
IN 2	P-	P+5 AO	70	8,8 (55)	+
IN 3	P-AO	P+5	80	6,6 (55)	+
IN 4	P-	P+5	20	0 (55)	ND
PC 1	P- AO	P+5 AO	100	26,5 (25)	+
PC 2	P-	P+5 AO	40	0 (25)	ND
PC 3	P-AO	P+5	80	13,25 (25)	+
PC 4	P-	P+5	0	0 (25)	ND

¹IN: explantes de plantas de caña de azúcar cultivadas *in vitro*; PC: explantes de plantas de caña de azúcar crecidas en condiciones de campo.

²La actividad GUS fue evaluada dos días después de la cocultivación en diez muestras seleccionadas al azar, mediante la utilización del procedimiento histoquímico estándar.

³El total de explantes infectados por *Agrobacterium* aparece entre paréntesis.

⁴Análisis por PCR del ADN genómico de un callo para cada tratamiento. ND: muestras no disponibles.

Tabla 3. Comparación de cuatro protocolos de transformación.

Protocolo	Explante inicial (N)	PPT ¹ Callos (M)	Eficiencia (M/N)x100	Callos positivos por GUS histoquímico y PCR	Plantas regeneradas	Plantas transferidas a condiciones de invernadero	Plantas resistentes a BASTA
A	100	35	35	10/10	2080	660	186 (28,2%)
B	100	14	14	5/5	2280	347	38 (11,2%)
C	100	21	21	5/5	450	102	40 (39,2%)
D	100	30	30	10/10	2240	153	96 (64,2%)

Las plantas transgénicas resistentes al herbicida, así como las plantas no transformadas ($n = 40$) fueron adaptadas a las condiciones de campo. Finalmente, se seleccionaron 112 individuos altamente resistentes a BASTA, los cuales procedían de 59 callos transformados. Todas las plantas no transformadas murieron (Tabla 4).

La novedad de este trabajo radica en el establecimiento de una nueva metodología para la transformación de la caña de azúcar con una eficiencia mayor que la de los métodos físicos descritos, así

como la generación de plantas transgénicas resistentes al herbicida BASTA.

Tabla 4. Resistencia a BASTA en condiciones de campo.

Protocolo	Plantas evaluadas (Q)	Nivel 1 (S)	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Resistencia (S/Q)x100
A	186	55	58	36	34	3	29,6
B	38	18	6	0	6	8	47,4
C	40	24	9	4	3	0	60,0
D	96	51	26	13	2	4	53,1
Control	40	0	0	0	0	40	0,0

Desarrollo de las aplicaciones de los marcadores moleculares en el mejoramiento de la caña de azúcar en Cuba

María T Cornide, Orlando Coto, Eduardo Canales, Antonio Sigarrosa, Jesús E Sánchez, Miguel Ramos Leal, Héctor Leonard Olivares, Florencio de Prada Esquivel, Ariel Arencibia, Dania Calvo, Gelasio Pérez Oramas, José M Mesa, Ernesto Fernández, Roberto Peña Urrutia

Dpto. de Biotecnología de las Plantas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ave 25 y 158, Cubanacán, AP 6990. Ciudad de La Habana. Cuba. Fax: (53-7) 33 0497; E-mail: blanca@biocnic.cneuro.edu.cu

Introducción

La caña de azúcar es un híbrido complejo de naturaleza autoploidice, apareamiento cromosómico bivalente con un sistema de reproducción preferentemente alogámico, y con capacidad de multiplicación vegetativa. El conocimiento y manejo de estas características determinan la eficiencia de los estudios genéticos y de los programas de mejoramiento. Se considera que las principales limitaciones del mejoramiento cañero tradicional, vía casi exclusiva de obtención de variedades nuevas, son las siguientes:

1. La estrecha base genética empleada con estos fines, tanto por la escasa representación de formas, como por la elevada consanguinidad entre los híbridos comerciales usados como progenitores.
2. La baja heredabilidad de los caracteres evaluados y el efecto de competencia en la población de posturas provenientes de semilla botánica durante la primera etapa del esquema, en la que se aplica la selección más rigurosa.
3. La elevada contribución del componente genotipo-ambiente en la varianza fenotípica total de los principales criterios de selección en las etapas clonales, lo que aumenta la duración del programa y obliga a la realización de ensayos replicados para localidades, cepas y épocas de siembra y cosecha.

Por estas razones, el empleo de los marcadores del polimorfismo del ácido desoxirribonucleico o marcadores moleculares (MM), junto a los métodos tradicionales de mejoramiento, constituye una vía poderosa para acelerar el conocimiento genético y aumentar la eficiencia del mejoramiento en la caña de azúcar.

El presente trabajo abarca un conjunto de resultados teórico-prácticos que permiten identificar y elegir con más eficiencia la variabilidad genética para la obtención de nuevas variedades, y para la aplicación de esta tecnología de gran impacto, estandarizada para cuatro sistemas de MM (RFLP, AFLP, RAMP y RAPD), en la

búsqueda de marcadores para la selección en la caña de azúcar y en otros cultivos de interés. Las investigaciones se realizaron en el marco de un proyecto CITMA del PNCT de Biotecnología Agrícola y de un proyecto CNIC financiado por el Consejo de Estado (1996-1998).

Caracterización molecular de materiales de interés en el mejoramiento

Caracterización del germoplasma básico utilizado en el mejoramiento de la caña

De los 15 clones ancestrales de mayor participación en la genealogía de las variedades cubanas, ocho son también germoplasma básico de los programas de mejoramiento de la Florida y Louisiana [1] y, al igual que en estos casos, los clones de *S. officinarum* de mayor participación son: Black Cheribon, Chunnee, Bandjarmasin Hitam, Loethers, Lahaina y Fiji.

Por primera vez en Cuba se estudió la diversidad genómica (por RFLP) de 27 clones de fundación de las variedades modernas de la caña de azúcar (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense* y *Erianthus* spp.), que están entre los más usados como germoplasma básico en el programa de nobilizaciones [2].

Las combinaciones de RFLP mediante el empleo de sondas heterólogas de maíz, resultaron de utilidad en la identificación de materiales de caña de azúcar con diferente grado de relación y complejidad genéticas, lo que confirmó resultados previos sobre la sintenia entre estas especies. Se reportaron diez bandas raras con presencia preferente o exclusiva en algunos clones de *Erianthus* spp. (B7, E13, H9), *S. spontaneum* (C2, C9, EC3); *S. officinarum* (EC8, EC9, H4) y *S. robustum* (EC7) de futura utilidad en trabajos de clasificación taxonómica. Se encontró una banda común sólo presente en los clones de *S. robustum* y *S. officinarum*

1. Deren GW. Genetic Base of U.S. Mainland Sugarcane. *Crop Sci* 1995;35: 1195-9.

2. de Prada F. Estudio y utilización de los recursos genéticos de la caña de azúcar. Tesis en Opción del Grado de Dr. en Ciencias Agrícolas. La Habana: MES; 1997.