

Las biotecnologías como ayuda a la difusión de variedades de caña de azúcar

La difusión y los intercambios de variedades de caña de azúcar aprovechan hoy los progresos de la biotecnología. Se ha constituido una colección de variedades *in vitro* para permitir el acceso rápido a un material de gran calidad agronómica y garantizado sano.

La caña de azúcar se multiplica por esqueje, en la que cada variedad es un clon. La creación de una nueva variedad por hibridación es un proceso particularmente largo y costoso para la caña de azúcar. Las razones son ante todo de tipo genético, pues las variedades presentan un genoma muy complejo, con 100 a 130 cromosomas resultantes de varias especies ancestrales. Cada cruce provoca la deestructuración completa de las características de las variedades parentales y sólo una proporción ínfima de los descendientes presenta un potencial agronómico. La evaluación de este potencial constituye la segunda

fuerza de complejidad. El ciclo de producción de la caña de azúcar incluye varias cosechas, con una primera etapa denominada «en virgen», un año después de la plantación de los esquejes, seguida de varios brotes cuyas características están poco relacionadas entre una etapa y otra, en especial entre la etapa «en virgen» y los brotes sucesivos. Además, en una misma etapa, se observan comportamientos variables según el medio y el año. Así, la selección de los clones más eficaces requiere dispositivos de evaluación particularmente pesados.

Los diferentes centros de selección del mundo producen variedades adaptadas a su región y estos



Brote de las yemas axilares de caña de azúcar.
Foto R. Fauconnier

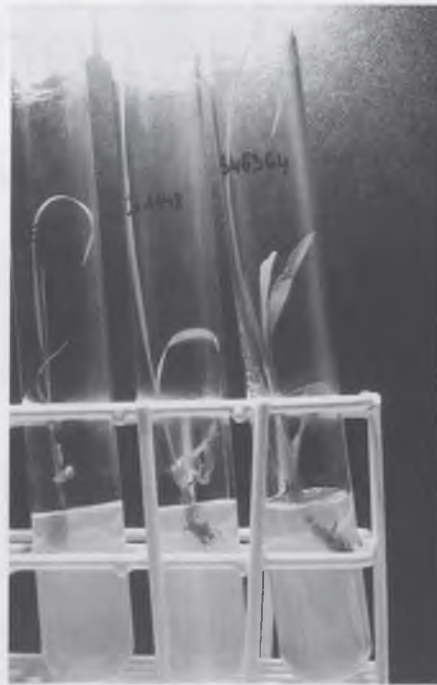
F. PAULET, J.-C. GLASZMANN
CIRAD-CA, BP 5035,
34032 Montpellier Cedex 1, Francia

materiales probados pueden tener un gran valor como genitores en otros programas de mejora varietal. También pueden revelarse adecuados fuera de su zona de selección y representar así una fuente de renuevo de las variedades en estaciones que no poseen su propio programa de mejora genética. La circulación de las variedades de caña de azúcar, difíciles de seleccionar, representa pues un factor de progreso importante.

El material vegetal transita en forma de esquejes que pueden propagar enfermedades. Desde 1978, el servicio de «Cuarentena internacional» organizado por el CIRAD en Montpellier (Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo) pone a disposición de numerosos países variedades de interés industrial o materiales de calidad cercana. Para obtener las garantías fitosanitarias requeridas, se necesitan dos ciclos de observación de un año, después de lo cual los clones pueden ser enviados a sus usuarios en forma de esquejes (BAUDIN, 1984). Debido a las exigencias materiales, este servicio se limita a una actividad de tránsito y no puede conservar los clones «liberados» después de la cuarentena.

Frente a estas limitaciones, se ha decidido constituir una colección de caña de azúcar *in vitro* posterior al servicio de cuarentena (PAULET y col., 1991).

Este tipo de colección, denominado «vitroteca», ya existe para diferentes plantas, como la papa o la yuca (ROCCA y col., 1989) y permite reunir de manera poco voluminosa materiales potencialmente útiles, representando así una fuente de abastecimiento rápido de material sano. Además, autoriza la aplicación de la criopreservación, un modo de conservación a muy largo plazo, útil para preservar recursos genéticos. El recurso a la electroforesis de enzimas y a las nuevas herramientas de la biología molecular refuerzan una administración rigurosa de la colección.



Almacenaje a 18°C de las plántulas *in vitro*.

Foto CIRAD-CA

La producción de plántulas *in vitro*

Las plántulas *in vitro*, llamadas «vitroplántulas», se obtienen mediante el cultivo de brotes axilares extraídos de plantas sanas, siguiendo los procedimientos definidos por SAUVAIRE y GALZY (1978).

El material de base en invernadero

Se efectúa un desqueje a partir de plantas liberadas de la cuarentena, garantizadas sanas. Después de haber prendido, los esquejes son transplantados y mantenidos en tierra. El desqueje provoca un rejuvenecimiento del vegetal, lo que favorece luego el desarrollo de los brotes al ponerlos en cultivo *in vitro*. Para minimizar los ataques de hongos saprófitos, indeseables después *in vitro*, se realizan tratamientos semanales fungicidas e insecticidas sistémicos en alternancia.

El cultivo *in vitro*

Las yemas más jóvenes (tres o cuatro por tallo) son extraídas de cañas de cuatro a seis meses, en el invernadero de Montpellier, y se ponen en cultivo en una caja de Petri en medio MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) a 25°C. Luego, se transplantan individualmente en tubo al cabo de dos a cuatro semanas, cuando aparecen los nuevos retoños. Al obtenerse 10 buenas plántulas, se transplantan separadamente en 10 tubos y se almacenan a 18°C en medio MS empobrecido. Estas condiciones frenan el crecimiento *in vitro* y, por lo tanto, disminuyen el volumen de manipulaciones necesarias. La vigilancia regular del nivel del medio nutritivo y de la desecación de las hojas permite detectar los clones que hay que transplantar prioritariamente. El intervalo entre dos transplantes puede variar entre seis meses y dos años según las variedades (capacidad de amacollamiento) y el agotamiento del medio.

Yema de caña de azúcar después de 15 días de transplante *in vitro*.

Foto CIRAD-CA



La utilización de vitroplántulas

Las vitroplántulas permiten introducir rápidamente una nueva variedad en una plantación; pueden convertirse directamente en esquejes o servir para una multiplicación acelerada por micropropagación *in vitro* (FELDMANN y ROTT, 1991).

El suministro de vitroplántulas

Apenas se formula un pedido, una parte de las vitroplántulas disponibles en la vitroteca de Montpellier se vuelve a colocar a 25°C para la multiplicación. Se necesitan entre tres y seis meses para producir una decena de nuevas plántulas por amacollamiento natural. Estas plántulas se transplantan entonces en un medio de arraigamiento para ser expedidas. Si dispone del laboratorio adaptado, el usuario podrá continuar la multiplicación siguiendo los mismos procedimientos. El plazo de espera para el suministro de plántulas se reduce pues a seis meses, mientras que, para reintroducir las variedades solicitadas en un nuevo ciclo de cuarentena, se necesitarían de dos a tres años.

El comportamiento de las plántulas obtenidas en cultivo *in vitro*

En el momento de la separación - pasaje de las condiciones *in vitro* a las condiciones naturales -, resulta esencial seguir rigurosamente el protocolo suministrado para optimizar el prendimiento en el campo (ver Ficha de separación de vitroplántulas de caña de azúcar). Las vitroplántulas de caña de azúcar transplantadas en el campo tienen una apariencia particular, diferente de las plántulas obtenidas de esquejes tradicionales (FELDMANN y ROTT, 1991). Estas modificaciones dependen de la variedad, pero se traducen por lo general en un aumento del amacollamiento y una disminución del diámetro de los tallos, lo que produce un rendimiento similar al de los esquejes. Estas diferencias se van borrando rápidamente durante los ciclos de multiplicación.

Estado actual de la vitroteca

La vitroteca de caña de azúcar de CIRAD, en Montpellier, creada en 1982, está constituida actualmente

de 363 variedades, la mayoría de las cuales se establece y conserva a 18°C. El aumento de su volumen ha hecho que se busquen diversas mejoras.

Contenido de la colección

La colección incluye 343 variedades, algunas de acceso libre y otras de sometido a la autorización del obtenedor (ficha variedades de caña de azúcar conservadas en vitroteca).

Estabilidad genética y técnica de crioconservación

Aunque la estabilidad genética parece estar garantizada en principio por el mantenimiento en estado de tejido organizado (brote o plántula, sin diferenciación celular) en medios de cultivo sin hormonas de crecimiento, es conveniente buscar una técnica que permita liberarse de las manipulaciones en vitroplántulas y, sobre todo, limitar las multiplicaciones celulares en condiciones artificiales. Ahora se dispone de una técnica de crioconservación (DEREUDDRE, 1994) puesta a punto en la variedad Co 6415 y que permite almacenar ápex encapsulados en bolas de alginato y sumergidos en nitrógeno líquido. Este método ha sido probado con éxito en 16 variedades y ha permitido tasas de regeneración comprendidas entre 14 y 91% (GONZALEZ ARNAO y col., 1993; PAULET y col., 1993). En teoría, permite una conservación de duración indefinida del material vegetal.

Control de la identidad del material

Debido al gran número de manipulaciones entre la llegada de un clon en forma de esquejes y su envío en forma de vitroplántulas, el control de la identidad de los clones es necesario para detectar los posibles errores de etiquetado. La electroforesis de enzimas brinda un medio de verifi-



Prendimiento del ápex a 10 días, después de crioconservación.

Foto P. Feldmann

cación. Un estudio piloto realizado con 62 variedades reveló 21 bandas polimórfas, es decir presentes en ciertas variedades y ausentes en otras. A partir de las 1891 comparaciones efectuadas (62 variedades comparadas dos a dos), no pudieron distinguirse únicamente dos pares. Las otras 58 variedades presentan una combinación única de bandas. Esta técnica requiere la extracción de las enzimas a partir de una hoja fresca joven y, por consiguiente, la disponibilidad de una planta joven. El polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP) es más difícil de revelar, pero presenta una potencia de discriminación muy superior, ya que suministran una verdadera huella genética de cada variedad. Contrariamente a la electroforesis de enzimas, el análisis de los RFLP puede realizarse con hojas secas, de modo que se pueden comparar en cualquier momento los clones de la colección de Montpellier con otros clones conservados en el campo en los trópicos.

Conclusión

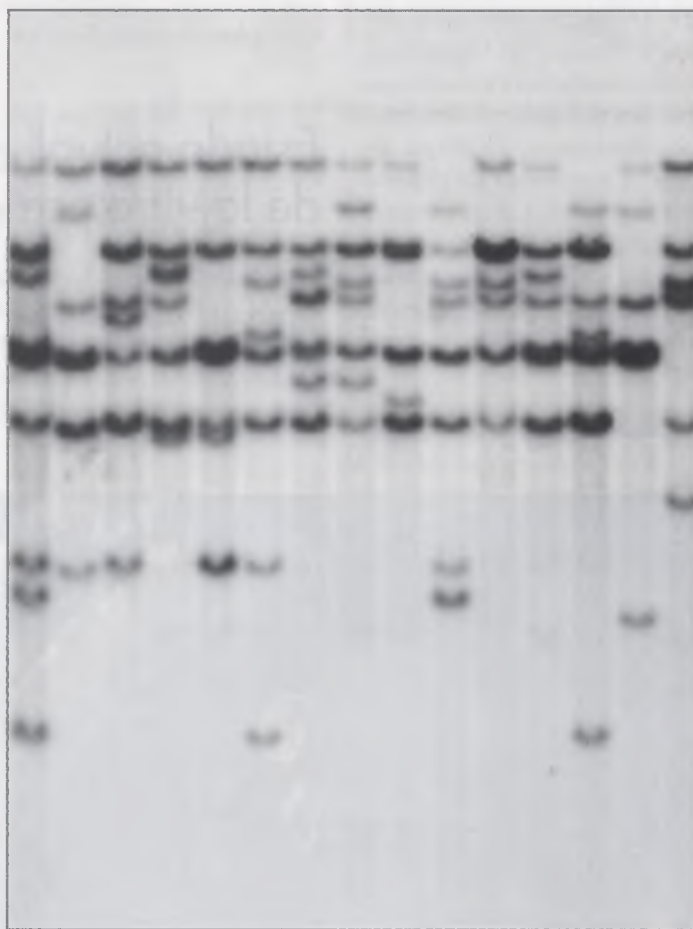
Las biotecnologías se utilizan a veces para crear una diversidad nueva y original, como es el caso, por ejemplo, de la transformación genética. En el caso de la colección de variedades de caña de azúcar descrita aquí, las biotecnologías son aplicadas para garantizar la integridad genética de materiales preciosos y constituyen un medio de mantener cientos, e incluso miles de variedades en un espacio muy reducido protegiéndolas totalmente de los insectos, las enfermedades y las incertidumbres climáticas, así como, en gran parte, de la deriva genética y las mezclas accidentales. Este tipo de dispositivo, de interés inmediato para la difusión de material varietal, tendrá probablemente su lugar en un marco internacional de conservación de los recursos genéticos de la caña de azúcar.

Huellas genéticas para las variedades de caña de azúcar

La revelación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN (aquí se toma en cuenta el ADN del núcleo y no el ADN del citoplasma) incluye varias etapas:

- la extracción del ADN;
- la digestión del ADN, es decir su corte en sitios bien determinados mediante enzimas llamadas «de restricción», que provoca la formación de fragmentos de longitudes diversas;
- la separación de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa en función de su longitud;
- la transferencia a una membrana de nylon de los fragmentos separados así;
- la «hibridación» molecular con una secuencia de ADN particular, llamada «sonda» (marcada previamente con fósforo 32 por ejemplo): entre los fragmentos presentes en la membrana, la sonda va a reconocer los que contienen una secuencia que le es similar y a fijarse en ellos;
- la revelación de los fragmentos reconocidos mediante la puesta en contacto de la membrana con una película autorradiográfica que será impresa por la radiactividad de la sonda.

De este modo, cada clon se caracteriza por un conjunto de bandas que constituye su huella genética (foto). Se dispone de muy numerosas sondas. El uso de cinco sondas solamente permitiría distinguir más de 10 000 variedades tomadas al azar.



Perfiles de bandas obtenidas para 15 variedades de caña de azúcar cuyo ADN ha sido cortado con la enzima de restricción Hind III, separado por electroforesis e hibridado con la sonda UMC39.

Foto J.-C. Glaszmann

Ficha de separación de vitroplántulas de caña de azúcar

Acondicionamiento de las vitroplántulas

Las vitroplántulas son acondicionadas en un medio de arraigamiento en tubos de plástico estériles y sellados. Tras transplantarse, se mantienen de tres a cuatro semanas a una temperatura de 25 a 30°C antes del envío.

Pasaje fuera de las condiciones estériles

Es posible cuando las vitroplántulas arraigadas tienen 5 ó 6 raíces de 2 a 3 centímetros. Abrir los tubos, extraer las plantas delicadamente, enjuagar las raíces con agua, cortar las hojas para limitar la evaporación y estimular el arranque de los brotes.

Tratamiento fungicida

Sumergir las plántulas en Benlate a 1 gramo por litro de producto comercial o en Aliette a 1 gramo por litro.



Inmersión de las plántulas en la solución fungicida.

El transplante de las plántulas

Separación de las vitroplántulas en Jiffy 7 (pastillas de turba comprimida). Antes, hacer hinchar los Jiffy 7 durante 10 minutos con la solución fungicida utilizada anteriormente. Hacer un agujero en la superficie del Jiffy 7 e introducir en él las raíces. Tapar y aplastar la turba alrededor de la plántula.



Transplante de las plántulas en Jiffy 7.



Vitroplántulas arraigadas, listas para ser separadas.

Las condiciones de separación

Poner las plántulas separadas al resguardo del viento y del sol. Limitar la desecación recubriendo con Jiffy 7 y plástico transparente hasta la emisión de dos o tres nuevas hojas. En caso de desecación, pulverizar con un poco de agua. Mantener con riegos diarios y completar unas dos o tres semanas más tarde con una solución de tipo abono foliar (ejemplo: Mairol, 2 gramos por litro de producto comercial). Controlar los ataques fúngicos con pulverizaciones de Bayleton 5 a razón de 1 gramo por litro de producto comercial, una vez por semana.

El pasaje al campo

Es posible al cabo de cuatro a seis semanas si el crecimiento es vigoroso. Sumergir el Jiffy 7 con su plántula en Bayleton a 1 gramo por litro, preparar el terreno, hacer un agujero para colocar el Jiffy 7. Tener cuidado de no deshacer el terrón y no dañar las raíces. Poner los Jiffy 7 directamente en la tierra. Cortar ligeramente las hojas para limitar la desecación. Si, al cabo de seis



Plántulas en Jiffy 7 en mini-invernadero.



Plántulas en invernadero, de 6 a 8 semanas de edad, en espera de plantación.

semanas en Jiffy 7, las plántulas no están suficientemente vigorosas, colocarlas en macetas que tengan más sustrato que los Jiffy 7 agotados. Tratar con un insecticida sistémico (Curater).

Efectuar el pasaje al campo cuando la temperatura del suelo sea superior a 18°C. Es conveniente una humedad elevada del aire y se aconseja pulverizar un poco de agua, incluso si hay irrigación.



El pasaje al campo.

Fotos P. Feldmann

Variedades de caña de azúcar conservadas en vitroteca

Laboratorio de cultivo in vitro,
CIRAD-CA, BP 5035
34032 Montpellier Cedex 1, Francia.

B37172	CB56-126	CoS443	CP70-1133	Ja64-11	N53216	R572	SP70-3225
B4362	Co312	CoS510	CP72-353	Ja64-15	NA56-79	R70367	SP70-3370
B46364	Co331	CP52-43	CP72-355	Ja64-20	NCo310	R7417	SP71-799
B47258	Co419	CP52-48	CP72-356	KWT57-423	NCo334	R75631	SP71-6163
B49119	Co421	CP57-603	CP72-370	L60-25	NCo376	RB7096	SP72-4928
B51129	Co449	CP59-73	CP72-1312	L62-96	Phil56226	RB70194	SP75-179
B52107	Co462	CP60-01	CP73-351	L65-69	Phil58260	RB705007	Tuc67-27
B60125	Co527	CP62-258	CP73-1547	L66-97	Phil6553	RB705146	Tuc68-18
B63118	Co740	CP63-306	CP74-383	L72-85	Phil6559	RB705375	Tuc68-19
B63119	Co775	CP63-588	CP74-2005	LF63-863	Phil6607	RB735220	Tuc69-117
B64277	Co785	CP65-357	CP77-414	LF66-2918	POJ2878	RB735275	Tuc71-5
C334-64	Co842	CP66-315	CRA6026	M31/45	PR1007	RB748022	Tuc72-16
C323-68	Co1001	CP66-346	EAK7076	M569/69	PR1016	RD7410	Tuc72-23
CB36-24	Co1148	CP67-412	FR80234	N11	PR61632	RP148-70	Tuc74-1
CB40-13	Co1157	CP67-413	FR80236	N12	R397	S17	Tuc74-6
CB41-76	Co1177	CP670	FR80412	N14	R469	SIP58-136	Tuc74-10
CB45-155	Co1202	CP68-350	IAC4865	N15	R472	SP70-1005	Tuc74-24
CB46-47	Co1230	CP68-1022	IAC51205	N16	R526	SP70-1078	Tuc74-26
CB47-15	Co62175	CP68-1026	IAC52150	N17	R566	SP70-1081	Tuc74-34
CB47-355	Co6304	CP68-1067	IAC58480	N18	R567	SP70-1284	Tuc74-46
CB49-260	Co6415	CP68-1154	IAC64257	N19	R568	SP70-1423	Tuc75-1
CB53-98	Co6806	CP69-1059	Ja59-03	N52219	R570	SP70-1478	Tuc75-2
B6504	B7695	B7882	B79118	H56-278	M657/66	MY64-26	Q126
B6623	B76102	B78130	B79130	H56-4848	M3035/66	NI1	Q127
B69379	B76113	B78178	B79226	H57-5174	M695/69	NIF3	Q129
B69566	B76132	B78224	B8007	H59-3775	MEX64-1214	NIN2	Q130
B69758	B76146	B78237	B8008	H62-4671	MEX65-1424	Q75	Q134
B70442	B76181	B78242	B8066	H65-7052	MEX66-1247	Q84	Q135
B70462	B76196	B78244	B8093	H66-4927	MEX68-200	Q90	Q137
B70482	B76247	B78245	B80276	H68-1158	MEX69-290	Q95	Q138
B70520	B76398	B78249	B80361	H68-2235	MEX70-485	Q96	RK65-37
B70531	B7784	B78266	B80689	H69-8235	Mol45-03	Q102	SES14
B70532	B7795	B78299	BJ7013	H69-9103	MQ72-1175	Q103	SES231
B72191	B77123	B78358	F146	H70-144	MQ72-4005	Q108	US56-15-8
B74254	B77126	B78360	F151	H72-8597	MQ72-5006	Q109	Galoa
B74359	B77392	B78366	F156	H73-6110	MQ72-5089	Q110	Kaba
B74477	B77415	B78436	F160	H75-8776	MQ76-23	Q111	Mali
B75300	B77565	B78482	F161	H77-6694	MQ76-53	Q113	Mana
B75412	B77639	B78560	F167	H78-7234	MY53-53	Q114	Ono
B75519	B77740	B78604	F175	HJ57-41	MY53-173	Q115	Tabongo
B75524	B7802	B78628	F176	M574/62	MY54-62	Q117	Triton
B75527	B7814	B78697	F178	M237/62	MY54-129	Q120	Trojan
B75532	B7852	B78700	H37-1933	M2173/63	MY55-14	Q121	Uba Naguin
B7639	B7877	B7997	H50-7209	M376/64	MY57-15	Q124	

Bibliografía

BAUDIN P., 1984. Quarantaine de canne à sucre à Montpellier, France. *L'Agronomie Tropicale*, 39(3): 262-267.

DEREUDDRE J., 1994. Un outil pour la conservation des ressources génétiques. *Biofutur*, 132: 39-41.

FELDMANN P., ROTT P., 1991. Un exemple d'application des techniques de culture *in vitro* en Guadeloupe : la propagation de vitroplants sains destinés aux pépinières de canne à sucre. Primer encuentro internacional en lengua francesa sobre la caña de azúcar, 10-15 juin 1991, Nogent sur Marne, Francia. AFCAS, París, Francia, págs 121-123.

GONZALEZ ARNAO M. T., ENGELMANN F., HUET C., URRÁ C., 1993. Cryoconservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing rate and histology. *Cryo-letters*, 14:300-308.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco medium culture. *Physiol. Plant*, 15:473-497.

PAULET F., ACQUAVIVA C., EKSOM-TRAMAGE T., LU Y.H., D'HONT A., GLASZMANN J.-C., 1991. La vitrothèque ou conservation d'une collection de canne à sucre *in vitro*. Primer encuentro internacional en lengua francesa sobre la caña de azúcar, 10-15 juin 1991, Nogent sur Marne, Francia. AFCAS, París, Francia, págs 49-52.

PAULET F., ENGELMAN F., GLASZMANN J.-C., 1993. Cryoconservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/deshydration. *Plant cells reports*, 12:525-529.

ROCCA W.M., CHAVEZ R., MARTIN M.L., ARIAS D.I., MAFLA G., REYES R., 1989. *In vitro* methods of germplasm conservation. *Genome*, 31:813-817.

SAUVAIRE D., GALZY R., 1987. Multiplication végétative de la canne à sucre (*Saccharum* sp.) par bouturage *in vitro*. *C.R. Acad. Sci.*, 278 D: 467-470.

Resumen... Abstract... Résumé

F. PAULET, J.-C. GLASZMANN — **Las biotecnologías como ayuda a la difusión de variedades de caña de azúcar.**

La difusión y los intercambios de variedades de caña de azúcar sacan provecho hoy de los progresos realizados en biotecnología. Como complemento del servicio de "cuarentena internacional" organizado por el CIRAD en Montpellier, se ha emprendido la constitución de una colección de caña de azúcar *in vitro*. Se ha llevado a cabo la regeneración *in vitro* de yemas axilares y la conservación en letargo de las plantulas obtenidas. Actualmente se tienen almacenadas cerca de 400 variedades (o clones), con 10 muestras por variedad. Esta "vitroteca" ocupa un espacio reducido y permite suministrar rápidamente plantas sanas para una amplia gama de material. Esta forma *in vitro* también posibilita la aplicación de la criopreservación, que es útil para la preservación de recursos genéticos. La utilización de la electroforesis de enzimas y de las nuevas herramientas de la biología molecular (RFLP) refuerza el control y la fiabilidad de la colección.

Palabras clave: *Saccharum*, caña de azúcar, clon, cultivo *in vitro*, biología molecular, electroforesis enzimática, criopreservación, vitroteca, cuarentena.

F. PAULET, J.-C. GLASZMANN — **Biotechnological support for varietal extension of sugarcane.**

Biotechnological advances have benefitted sugarcane varietal extension and exchange. An *in vitro* sugarcane collection has now been set up as a supplement to the "International Quarantine Service" organized by CIRAD in Montpellier (France). *In vitro* sucker regeneration and latency conservation of the resulting plantlets has been developed. Almost 400 varieties or clones (10 specimens of each) have now been stored. This "vitrotheque" does not take much space and enables distribution of a broad range of healthy plants rapidly. This *in vitro* plant material can also be cryopreserved, a useful procedure for genetic resource conservation. Enzyme electrophoresis and other molecular biology tools (RFLP) are used to control the collection, thus quarantining its reliability.

Key words: *Saccharum*, sugarcane, clon, *in vitro* culture, molecular biology, enzyme electrophoresis, cryopreservation, vitrotheque, quarantine.

F. PAULET, J.-C. GLASZMANN — **Les biotechnologies en soutien à la diffusion variétale chez la canne à sucre.**

Diffusion et échanges variétaux chez la canne à sucre bénéficient aujourd'hui des progrès en biotechnologie. En complément du service de « quarantaine internationale » organisé par le CIRAD à Montpellier, il a été entrepris de constituer une collection de canne à sucre *in vitro*. La régénération *in vitro* de bourgeons axillaires et la conservation en vie ralentie des plantules obtenues ont été mises au point. Près de 400 variétés (ou clones) sont maintenant stockées à raison de 10 échantillons chacune. Cette « vitrothèque » occupe un espace réduit et permet de fournir rapidement des plants sains pour une large gamme de matériel. Cette forme *in vitro* rend possible également l'application de la cryoconservation, utile pour la préservation des ressources génétiques. Le recours à l'électrophorèse d'enzymes et aux nouveaux outils de la biologie moléculaire (RFLP) vient renforcer le contrôle et la fiabilité de la collection.

Mots-clés : *Saccharum*, canne à sucre, clone, culture *in vitro*, biologie moléculaire, électrophorèse enzymatique, cryoconservation, vitrothèque, quarantaine.