

## **Marcadores moleculares y citogenéticos para la identificación y caracterización de una colección de trabajo de clones del complejo *Saccharum* para la nobilización.**

**Orlando Coto<sup>(1)</sup>, Mayra Rodríguez<sup>(2)</sup>, Roxana Portieles<sup>(2)</sup>, Raisa Rodríguez<sup>(2)</sup>, María T. Cornide<sup>(3)</sup>, Ingrid Hernández<sup>(2)</sup>, Eduardo Canales<sup>(2)</sup>, Osvaldo Oliva<sup>(2)</sup>, Florencio de Prada<sup>(3)</sup> y Gelasio Pérez<sup>(3)</sup>.**

**(1) Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, 7ma, No. 3005, entre 30 y 32, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba, e-mail [iicit@ceniai.inf.cu](mailto:iicit@ceniai.inf.cu)**

**(2) División de Plantas, CIGB, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.**

**(3) Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), MINAZ.**

### **Introducción**

Tradicionalmente, las variedades utilizadas en el mejoramiento se identifican mediante marcadores morfológicos y agronómicos, los cuales muchas veces se complementan con marcadores fisiológicos, bioquímicos o citogenéticos.

La caracterización, identificación, conservación y manejo de los ancestros y clones silvestres útiles para la ampliación de la base genética, son objetivos priorizados de las investigaciones en los programas de mejora en la actualidad.

Las nuevas variedades que se obtienen deben ser diferenciadas de las ya registradas a partir de la expresión de al menos una característica mostrando uniformidad, estabilidad y una buena descripción de ellas. Los marcadores agronómicos y fenotípicos son básicamente usados para este fin, pero se conoce que con frecuencia son altamente influenciados por el ambiente; y los experimentos para evaluar tales influencias son procesos lentos y costosos.

Por otro lado, a partir del incremento del tamaño de las colecciones, se hace más difícil evitar la inclusión de duplicados o accesiones muy similares, lo que implica un considerable gasto de recursos dedicados al mantenimiento, la evaluación y el manejo. Los retos para el futuro incluyen la explotación práctica de los marcadores moleculares para dar respuestas a interrogantes ecológicas y biológicas y para el establecimiento de colecciones núcleo para el manejo eficiente del germoplasma (Gepts, 1995).

Los marcadores moleculares han sido reportados también como auxiliares de los descriptores tradicionales en la selección de representantes de la diversidad genética total que se encuentra en el germoplasma en el esfuerzo por establecer colecciones núcleo (Tohme y col., 1996; Berthaud, 1997; Bonierbale y col., 1997). Se espera que los descriptores moleculares se incluyan en las bases de datos de las colecciones de germoplasma si garantizan la identificación inequívoca de cada accesión a partir de su reproducibilidad, representatividad y suficiente cantidad de información (IPGRI, 1997).

Por otra parte, los métodos de análisis citogenéticos permiten identificar los híbridos y seleccionarlos por su estabilidad cromosómica en cada etapa del proceso aumentando considerablemente su eficiencia. Desde el punto de vista citológico, para el género *Saccharum* se han reportado variaciones en cuanto al número de cromosomas entre células pertenecientes a una misma planta y aún a un mismo tejido. La ocurrencia de este fenómeno de mosaicismo cromosómico fue reportado por Heinz y col., (1969).

Otro de los métodos utilizados en la identificación de cromosomas en especies vegetales por su alta resolución es la técnica de Bando-C, que se refiere a regiones de heterocromatina constitutiva que no se descondensan en interfase, siendo visibles tanto en mitosis como en interfase y de tamaño relativamente constante y que pueden ser centroméricas, teloméricas o intersticiales. Este método ha sido aplicado a especies con grandes cromosomas, como trigo, centeno y cebada entre otros; permitiendo una identificación precisa de los cromosomas y la definición de las señas cromosómicas. Para plantas con cromosomas pequeños como arroz, *Arabidopsis* y *Brassica*, que miden de 1-2  $\mu\text{m}$  en metafase mitótica, ha habido dificultades para identificar sus cromosomas objetivamente por medios morfológicos, en el caso de la caña de azúcar recientemente, Rodríguez y Portieles (2003), pusieron a punto la técnicas de bando C, para ser aplicada en estudios citogenéticas de este cultivo.

En caña de azúcar, a pesar de varios intentos, no ha sido aceptado internacionalmente un sistema de descripción de cultivares; mejoradores australianos plantean el uso de descriptores morfológicos, hasta que se demuestren las potencialidades y los costos en la aplicación de los análisis de ADN (Gallacher, 1997); no obstante, se acepta la necesidad de variantes adicionales, como la combinación de caracteres morfológicos y marcadores moleculares, para detectar clones mal clasificados (Gallacher y Berding, 1997).

No obstante, la incorporación de los descriptores moleculares en las bases de datos del germoplasma garantiza la identificación taxonómica e individual de forma rápida y confiable de cada accesión a la vez que brinda la información para su recomendación como progenitores basada en la diversidad genética.

En este sentido, los requerimientos esenciales para la selección de un descriptor molecular, han sido aplicados con efectividad en materiales del germoplasma cubano de caña de azúcar (Cornide y col., 2000) y han permitido establecer en Cuba una base de datos de descriptores moleculares de diferentes tipos con los fines antes mencionados. Este sistema descansa en los estudios de caracterización botánica, morfológica, agronómica y molecular de un grupo de colecciones de germoplasma de interés mejorador. Fue realizado por un equipo multidisciplinario de trabajo del CNIC y del INICA. En este sentido los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar los marcadores moleculares de RFLP empleando sondas citoplasmáticas y amplificación específica, para la identificación individual y de grupos de diversidad genética en la colección de clones del complejo *Saccharum* previamente diseñada; 2) determinar los marcadores citogenéticos de conteo de número cromosómico y bando C para la identificación individual y de grupos de diversidad en la colección de clones del complejo *Saccharum* previamente diseñada.

## **Materiales y Métodos**

### **Análisis Molecular**

El ADN genómico total de cada genotipo se aisló según el procedimiento propuesto por Hoisington (1992). Para los análisis de RFLP las muestras de ADN purificadas se digirieron con las enzimas de restricción *Hind* III, *Bam*H I, *Eco*R I y *Eco*R V, según las recomendaciones del fabricante.

Las electroforesis de los ADN digeridos para la separación de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa 0.8 % en buffer TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1mM) y las transferencias a membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) se realizaron por el procedimiento alcalino (NaOH 0.4 N).

Se empleó el método de marcaje radioactivo de las sondas con <sup>32</sup>P y las hibridaciones se realizaron según el protocolo propuesto por Hoisington (1992). Los fragmentos RFLP se nombraron teniendo en cuenta las enzimas que les dieron origen (B, E, H, y V) para *Bam*H I, *Eco*RI, *Hind* III y *Eco*RV respectivamente, seguidos del número consecutivo correspondiente a su ubicación en la placa de mayor a menor peso molecular. Los pesos moleculares se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular Raoul I (Appligene).

Se procedió a ratificar en la colección, los marcadores de grupos de diversidad citoplasmática que aparecen en la tabla 1.

Tabla 1. Sondas citoplasmáticas que revelan marcadores de grupo empleadas la colección de trabajo.

Tipo de polimorfismo	Sonda	Marcador de grupo (G)
Citoplasmático		
Mitocondrial	ATPasa subunidad 6 de maíz (ATPasa6).	IC <sub>3</sub> de <i>Erianthus</i> spp. BC <sub>14</sub> del citofondo E (ECL)
	ATPasa subunidad 9 de maíz (ATPasa9)	VC <sub>18</sub> de <i>Saccharum</i> spp.
Cloroplasto	Rubisco subunidad mayor de ribulosa 1,5	HC <sub>13</sub> de <i>Erianthus</i> spp.
	bifosfato carboxilasa de espinaca (Grd. Rubisco)	BC <sub>7</sub> de citofondo E (ECL)

IC, BC, VC, HC,: RFLPs citoplasmáticos obtenidos de restrictos de las enzimas de restricción *Eco*R I, *Bam*H I, *Eco*R V y *Hind* III respectivamente.

Se realizó la amplificación del r-ADN 5S con los cebadores reportados en las especies *Erianthus arundinaceus* (fragmento de 500 bp) y *Saccharum officinarum* y *Saccharum robustum* (fragmento de 320 bp) por D'Hont y col. (1998) y correspondientes a las secuencias:

5'-GTGACCTCCTGCGAAGTCCT-3'

5'-CCCATCCGTGTACTACTCTC-3'.

La reacción se realizó según D'Hont y col. (1998) empleando 5 ng de ADN genómico de cada genotipo como molde y usando el siguiente programa: 1 ciclo de 3 min. a 94 °C; 27 ciclos de 55 seg. a 93 °C, 15 seg. a 55 °C y 30 seg. a 72 °C. Los resultados de todas las amplificaciones fueron analizados en geles de agarosa 1.5 % en tampón TBE a 10 V/cm.

### Selección de los marcadores moleculares

La selección de los descriptores moleculares (marcadores de grupos de diversidad **G** y marcadores individuales **I**) se basó en los principios descritos por Cornide y col. (2000). Para ello, las bandas más discriminatorias entre grupos taxonómicos y/o entre grupos de diversidad clonal determinados en

estudios previos de caracterización, se seleccionan como marcadores (G e I) a partir de Análisis Factorial de Correspondencias (FAC) (STATITFC 4.0, 1988) efectuados de forma iterativa con la matriz de datos binarios originales considerando 1 como presencia y 0 como ausencia (Benzecri, 1973).

### **Marcadores citogenéticos.**

#### **Conteo de cromosomas.**

Para cada clon estudiado, se tomaron muestras de 2 plántones escogidos al azar; y de cada individuo muestreado, se tomaron trozos de tallo de los tercios medio e inferior conteniendo de dos a tres entrenudos. Luego de su esterilización con bicloruro de mercurio al 0.1%, se germinaron en la estufa a una temperatura de 36 °C a 38 °C, manteniendo la humedad. Las raíces de aproximadamente 1 cm de longitud fueron pre-tratadas con 8-hidroxiquinolina al 0.002 % durante tres horas a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con agua destilada. La fijación se realizó en una mezcla de etanol-ácido acético glacial (3:1), durante 24 horas. Después de lavarse con agua destilada, se conservaron en etanol al 70% a 10 °C. Las raíces se hidrolizaron en HCl 1N a 60 °C durante 15 minutos y una vez lavadas en agua destilada se realizó la tinción con hematoxilina de Gomori durante dos horas a 60 °C. A los ápices colocados en el portaobjeto se les añadió gota a gota HAc glacial al 45%. Luego de colocado el cubreobjeto se flameó la preparación y se realizó el aplastamiento. Por último se observaron las preparaciones en un microscopio óptico Olympus Vanox - T con cámara fotográfica acoplada, y se contaron los números cromosómicos en 50 células por clon, fotografiándose las mejores placas metafásicas.

#### **Bandeo C, tinción con Giemsa**

El pre-tratamiento y la fijación de los ápices radicales fue similar al utilizado en la técnica para el conteo de cromosomas. Se utilizó el procedimiento descrito por Rodríguez y Portieles (2003). Fueron fotografiadas las mejores placas cromosómicas, sin cromosomas superpuestos, tomándose 10 muestras de cada individuo.

Se tuvieron en cuenta ocho indicadores cromosómicos de acuerdo a la posición de las bandas heterocromáticas:

1. Bandas centroméricas
2. Bandas teloméricas en un brazo
3. Bandas teloméricas en ambos brazos
4. Bandas teloméricas en un brazo y centroméricas
5. Bandas teloméricas en ambos brazos y centroméricas
6. Bandas teloméricas en un brazo e intersticiales a lo largo del cromosoma
7. Bandas teloméricas en ambos brazos e intersticiales a lo largo del cromosoma
8. Bandas intersticiales a lo largo del cromosoma

Con el objetivo de conocer los indicadores de mayor contribución a la diversidad de los clones estudiados, se efectuaron sendos Análisis Factoriales de Correspondencia Simple (FAC), empleando como variable estos indicadores

y como individuos los clones de especies *Saccharum* y los clones de *Erianthus* spp.

## Resultados y Discusión

### Identificación mediante marcadores moleculares

Están representadas en la colección 34 formas silvestres de origen desconocido (clones ECL); 30 clones *S. officinarum* y un híbrido simple; *S. spontaneum* (9); *S. robustum* (2); *S. barberi* (3); *S. sinense* (6) y *Erianthus* spp. (4) (Tabla 2).

El polimorfismo del ADN revelado mediante RFLP citoplasmático (Figura 1) y amplificación mediante cebadores específicos (Figura 2), permitieron confirmar la identificación de clones de *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *Erianthus* spp. y clones ECL, previamente reportada por Cornide y col. (2000) y Coto y col. (2002). Adicionalmente, se reporta la extensión del uso de estos marcadores a otras especies de caña de azúcar como *S. robustum*, *S. sinense* y *S. barberi*.

Los resultados alcanzados con el uso de cebadores específicos están en concordancia con los reportados por D'Hont y col. (1995, 1998) quienes detectaron variaciones en el gen del ADN ribosomal 5S de clones *S. spontaneum*, *S. officinarum* y *E. arundinaceus* con estos cebadores y permiten reportar, por primera vez, la amplificación con el par de cebadores del gen del ADN ribosomal 5S para las especies *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *E. elegans* y *E. sara* (Figura 2). El clon ECL 6-1-85, no estudiado anteriormente e incluido en la colección, mostró amplificación del fragmento de 500 pb característico de *Erianthus* spp. (Tabla 2).

### Identificación por conteo cromosómico

Se detectó coincidencia entre el número cromosómico de un grupo de clones ECL ( $2n=30-40$ ) y el número reportado para el género *Erianthus* (Sreenivasan et al. 1987). Los clones pertenecientes a la especie *S. spontaneum* mostraron un rango de número cromosómico de  $2n = 40, 42, 44, 54, 56, 64, 72, 80, 96, 112$  y  $128$ , de acuerdo con su número básico de  $x = 8$  (Figura 3). El número básico de esta especie fue recientemente confirmado por estudios de marcadores moleculares (D'Hont y col., 1996). Estas observaciones permitieron concluir que un grupo importante de clones ECL presentan un número cromosómico dentro del rango descrito para esta especie y confirmaron su identificación taxonómica por amplificación con cebadores específicos y RFLP con sondas citoplasmáticas previamente establecida (Cornide y col., 2000; Coto y col., 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de la colección de trabajo evaluada. Grupos de diversidad por caracterización integral, diversidad nuclear por amplificación específica, diversidad citoplasmática, número cromosómico y bandeo-C.

Genotipo	Amplificación <sup>(1)</sup>		Grupo de caracterización integral <sup>(2)</sup>	Grupo de diversidad citoplasmática <sup>(3)</sup>	Grupo de diversidad nuclear <sup>(4)</sup>	Número Cromosómico 2n <sup>(5)</sup>	Grupo de Diversidad por Bando-C <sup>(6)</sup>
	500 pb	320 pb					
E. sara (e)	+	-	3	D	E	2n = 40-60	-
E. elegans (e)	+	-	1	D	E	2n = 40	-
NC 100 (e)	-	+	1	B	E	-	-
ECL 6-10-85	-	+	1	C	I	2n = 64-80	-
ECL 1-30-85	+	-	1	E	I	2n = 30-40	A
ECL 1-24-85	+	-	1	E	I	2n = 30-40	A
ECL 6-6-85	+	-	1	E	III	2n = 30-40	A
ECL 5-4-85	+	-	1	C	I	2n = 30-40	A
ECL 1-7-85	-	+	3	C	I	2n = 64-80	-
ECL 1-33-85	-	+	3	C	I	2n = 60-80	-
ECL 1-26-85	-	+	1	C	I	2n = 64-80	-
ECL 1-12-85	-	+	3	C	III	2n = 64-80	-
ECL 1-18-85	-	+	3	C	I	2n = 64-76	-
ECL 1-32-85	-	+	3	C	I	2n = 54-76	C
ECL 1-8-85	-	+	3	C	I	2n = 64-80	-
ECL 1-10-85	-	+	3	C	III	2n = 56-72	-
ECL 1-6-85	-	+	3	C	I	2n = 54-80	-
ECL 1-19-85	-	+	3	C	I	2n = 60-80	-
ECL 1-37-85	-	+	3	C	I	2n = 58-76	-
ECL 1-15-85	-	+	3	C	I	2n = 64-80	-
ECL 1-17-85	-	+	3	C	III	2n = 54-74	-
ECL 1-36-85	-	+	3	C	I	2n = 72-80	-
ECL 3-5-85	-	+	3	C	I	2n = 56-80	C
ECL 3-2-85	-	+	3	C	I	2n = 64-80	-
ECL 3-8-85	-	+	3	C	I	2n = 64-80	C
ECL 3-10-85	-	+	3	C	I	2n = 58-72	-
ECL 3-14-85	-	+	3	C	I	2n = 64-80	-
ECL 3-11-85	-	+	3	C	I	2n = 64-74	-
ECL 1-29-85	+	-	1	C	I	2n = 30-40	B
ECL 3-13-85	-	+	3	C	I	2n = 64-74	-
ECL 4-3-85	-	+	3	B	I	2n = 60-72	-
ECL 6-8-85	-	+	3	C	I	2n = 64-80	-
ECL 6-7-85	-	+	3	C	III	2n = 54-66	-
ECL 1-31-85	+	-	1	B	I	-	B
Nagori (s)	-	+	3	B	-	-	-
Mandalay (s)	-	+	3	B	-	-	-
Burma (s)	-	+	3	B	-	-	-
SH 244 (s)	-	+	3	B	D	-	-
SES 13 (s)	-	+	1	B	D (II)	2n = 54-64	C
SES 182 (s)	-	+	3	B	D (II)	2n = 64-80	-
Tabongo (s)	-	+	3	B	D (II)	2n = 80	-
US 56-15-8	-	+	3	B	-	-	-
ECL 3-3-85	-	+	3	B	I	2n = 56-80	-
ECL 1-35-85	-	+	3	B	I	2n = 64-72	-
ECL 6-1-85	+	-	3	D	-	2n = 30-40	-
51 NG 63 (r)	-	+	3	B	-	-	-
51 NG 91 (r)	-	+	3	B	-	-	-
Japonesa (si)	-	+	4	B	-	-	-
Cayana 10 (si)	-	+	4	A	-	-	-

Oshima (si)	-	+	4	A	-	-	-
Uba (si)	-	+	4	A	-	-	-
Uba del Natal	-	+	4	A	-	-	-
Tekcha (si)	-	+	4	A	-	-	-
Kewali (b)	-	+	4	A	-	-	-
Hemja (b)	-	+	4	A	-	-	-
Hatooni (b)	-	+	2	A	-	-	-
Chunnee (b)	-	+	4	A	-	-	-
Morada	-	+	-	A	-	-	-
CP 36-112	-	+	4	A	-	-	-
Monjet Gayan	-	+	4	A	-	-	-
IJ 8001 (o)	-	+	4	A	-	-	-
IJ 8002 (o)	-	+	4	A	-	-	-
PSA 49 (o)	-	+	4	A	-	-	-
51 NG 92 (o)	-	+	2	A	-	-	-
Tibbo Mird (o)	-	+	4	A	-	-	-
Keong Java	-	+	4	A	-	-	-
Migronne (o)	-	+	4	A	-	-	-
Ajax (o)	-	+	4	A	-	-	-
28 NG 15 (o)	-	+	4	A	-	-	-
NC 30 (o)	-	+	4	A	-	-	-
NC 39 (o)	-	+	2	A	-	-	-
NC 33 (o)	-	+	4	A	B	-	-
NC 80 (o)	-	+	4	A	B	-	-
Cristalina (o)	-	+	4	A	A	-	-
Horne (o)	-	+	2	A	A (II)	-	-
Badila (o)	-	+	4	A	A	-	-
Areneta (o)	-	+	2	A	B	-	-
Loethers (o)	-	+	1	A	B	-	-
Rarotonga 2	-	+	4	A	B	-	-
H. Broewang	-	+	2	A	B	-	-
B. Hitam (o)	-	+	4	A	C	-	-
Zopilota (o)	-	+	2	A	A	-	-
Caiara (o)	-	+	4	A	A	-	-
B. Cheribon	-	+	4	A	B (II)	-	-
Rarotonga 1	-	+	4	A	-	-	-
Djapara Red	-	+	4	A	B	-	-
A. Mauritius	-	+	4	A	C	-	-
Morada	-	+	4	A	A	-	-
H. Rwandang	+	-	2	D	-	2n = 40-60	-

(1) Resultados de la amplificación con el cebador r-ADN 5S (Coto y col., 2002).

(2) Caracterización integral según de Prada y col., (2000), grupos 1 y 3 para resistencia múltiple, y resistencia a la roya y rendimiento agrícola respectivamente .grupos 2 y 4 contenido azucarero y rendimiento agrícola.

(3) Grupos de diversidad citoplasmática según Coto y col. (2002).

(4) A, B, C y D, grupos de diversidad nuclear según Cornide y col. (2000); I, II y III, grupos de diversidad nuclear según Coto (2001).

(5) Números cromosómicos según Portieles y col., (2002)

(6) A, B y C, grupos de diversidad de acuerdo al Bandedo-C según Portieles y col., (2003).

e, s, si, b, r, o: clones clasificados como *Erianthus* spp., *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinense*, *Saccharum barberi*, *Saccharum robustum* y *Saccharum officinarum* respectivamente según el catálogo del Banco del Germoplasma del INICA (Pérez y col. 1997).

ECL: clones silvestres colectados en la Expedición Cuba-Laos.

HS: clon de origen híbrido simple.

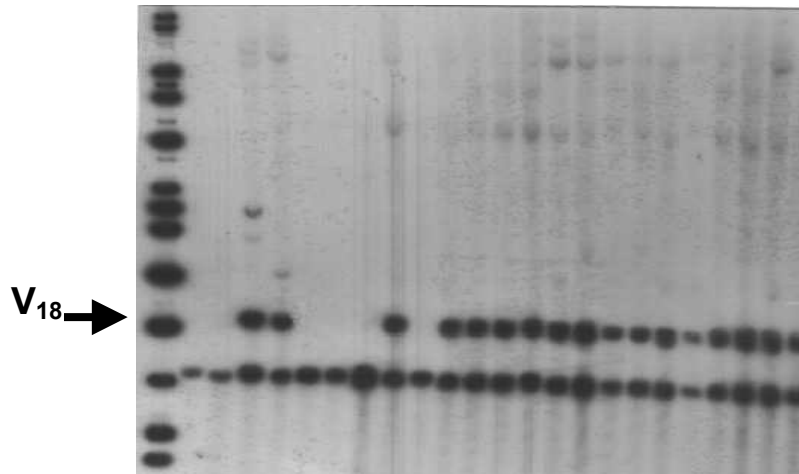


Figura 1. Patrones RFLP citoplasmático para la combinación enzima-sonda *EcoRV-ATPase 9* de un grupo de clones de la colección estudiada.

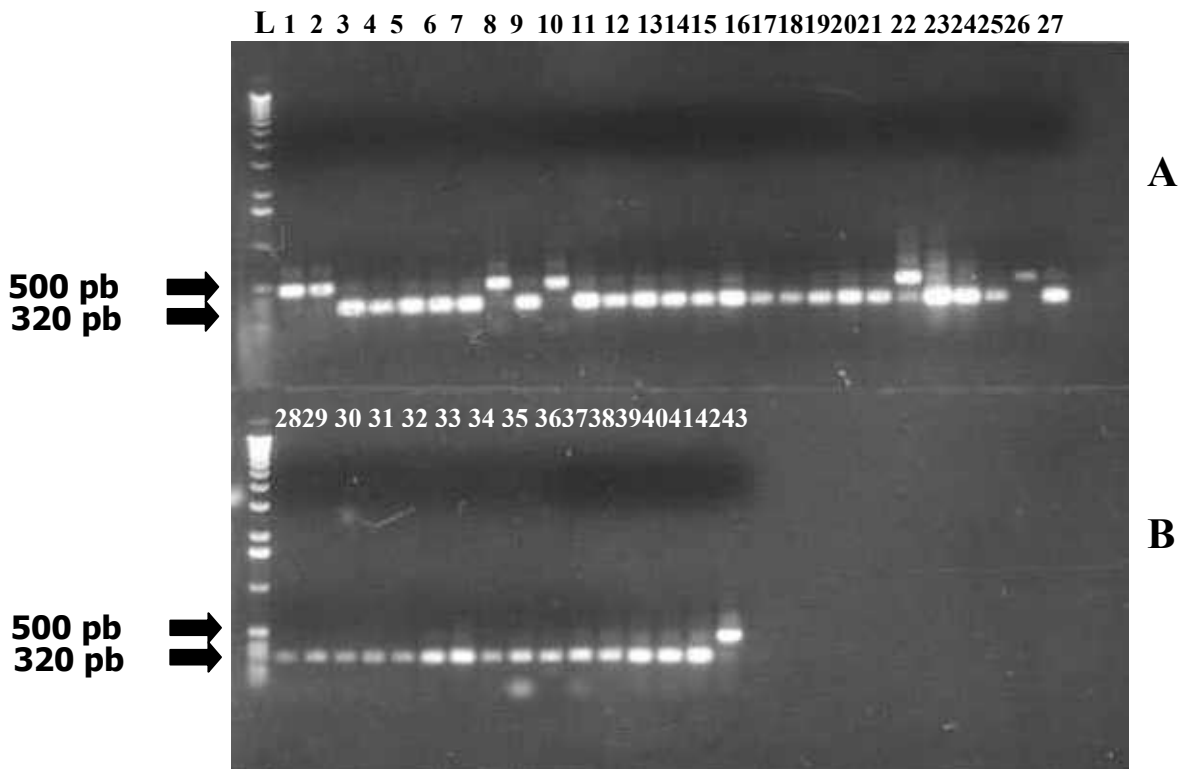


Figura 2. Amplificación con cebadores específicos del gen del r-ADN 5S. de un grupo de clones del complejo *Saccharum* estudiados.

L: Ladder 1 Kb (Appligene).

**A:** 1.ECL 1-31-85, 2.ECL 1-24-85, 3.ECL 1-6-85, 4.ECL 1-7-85, 5.ECL 1-8-85, 6.ECL 1-10-85, 7.ECL 1-12-85, 8.ECL 1-30-85, 9.ECL 1-14-85, 10.ECL 6-6-85, 11.ECL 1-15-85, 12.ECL 1-17-85, 13.ECL 1-18-85, 14.ECL 1-19-85, 15.ECL 1-26-85, 16.ECL 1-32-85, 17.ECL 1-33-85, 18.ECL 1-36-85, 19.ECL 1-37-85, 20.ECL 3-1-85, 21.ECL 3-2-85., 22.ECL 5-4-85, 23.ECL 6-10-85, 24.ECL 6-7-85, 25.ECL 6-8-85, 26.ECL 1-29-85, 27.ECL 3-3-85

**B:** 28.ECL 3-5-85, 29.ECL 3-8-85, 30.ECL 3-13-85, 31.ECL 3-10-85, 32.ECL 3-14-85, 33.ECL 3-11-85, 34.ECL 3-15-85, 35.NC 100, 36.ECL 4-3-85, 37.Tabongo, 38.SH 244, 39.SES 13, 40.SES 182, 41.Home, 42.Black Cheribon, 43. *Erianthus elegans* , pb: pares de bases



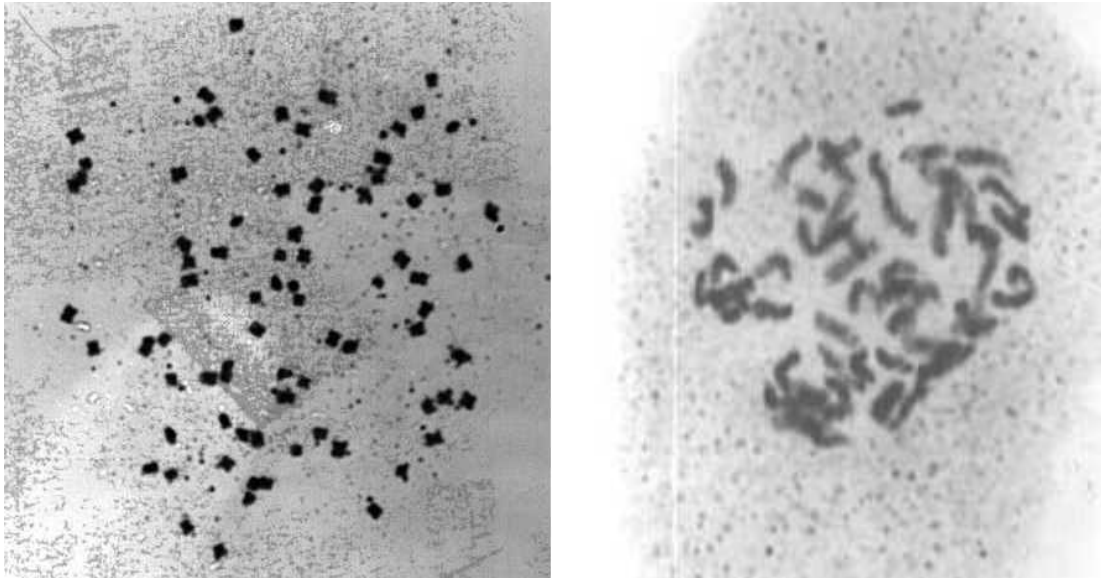


Figura 3. Ejemplos de cariotipos detectados  
 Izquierda: Cariotipo del clon testigo *Saccharum spontaneum*: Tabongo ( $2n=80$ ); x 400,  
 Derecha: Cariotipo del clon testigo de *Erianthus*: *E. sara* ( $2n=53$ ); x 400.

### Identificación por patrones de bandeo-C

Se identificaron bandas distribuidas en diferentes regiones a lo largo de los cromosomas (Figura 4). Un grupo de clones presentaron semejanzas con el género *Erianthus* en cuanto al número, tamaño de los cromosomas, y definición de las bandas. En relación con la posición de las bandas, estos clones mostraron características comunes entre el género *Erianthus* y *Saccharum*. por lo que pudieran constituir híbridos (grupo B, Tabla 2).

Los análisis factoriales de correspondencia indicaron que de los ocho indicadores iniciales basados en la ubicación de las bandas C, cuatro fueron los de mayor representación entre los clones de la colección evaluados: las bandas teloméricas en un brazo, bandas teloméricas en un brazo y centroméricas, bandas teloméricas e intersticiales en un brazo del cromosoma y bandas teloméricas en ambos brazos e intersticiales a lo largo del cromosoma. Estos patrones de bandeo-C permitieron agrupar a los clones evaluados en tres grupos:

- Grupo A integrado por los clones *Erianthus*, caracterizados por la ausencia de bandas teloméricas en un brazo y la presencia de bandas teloméricas en ambos brazos e intersticiales a lo largo del cromosoma.
- Grupo B integrado por clones híbridos, caracterizados por la presencia de bandas teloméricas en un brazo y bandas teloméricas en ambos brazos e intersticiales a lo largo del cromosoma.
- Grupo C integrado por los clones *Saccharum*, caracterizados por la presencia de de bandas teloméricas en un brazo y bandas teloméricas en ambos brazos e intersticiales a lo largo del cromosoma.

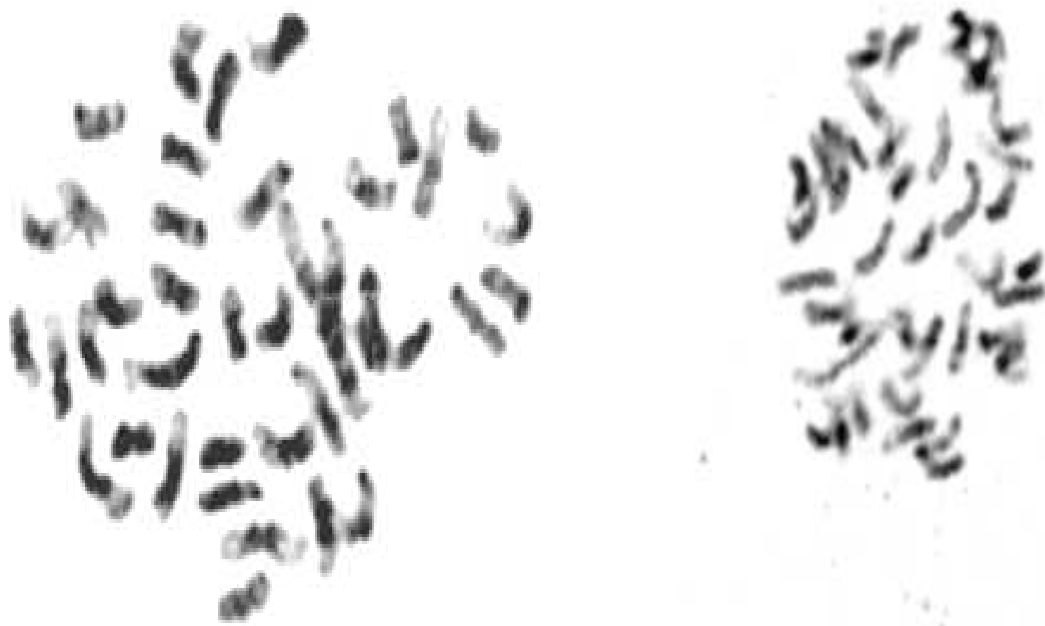


Figura 4. Metafasas somáticas, bandeo-C de los clones silvestres izquierda: *Erianthus* spp. ECL 6-6-85 (2n= 40) 400x, derecha: híbrido *Saccharum* x *Erianthus* ECL 1-29-85 (2n = 40) 220x

## Conclusiones

Los resultados obtenidos confirmaron la identificación en la colección evaluada de clones pertenecientes a los géneros *Erianthus*, *Saccharum* y posibles híbridos *Saccharum* x *Erianthus* entre los clones silvestres colectados.

Se confirmó mediante marcadores moleculares y citogenéticos que los clones ECL colectados e incluidos en la colección constituyen nuevas accesiones representantes de los géneros *Erianthus* (ECL 1-24-5, 1-30-85, 6-6-85, 6-1-85, 5-4-85 y 1-29-85) y *Saccharum* (ECL 1-6-85, 1-7-85, 1-8-85, 1-10-85, 1-12-85, 1-14-85, 1-15-85, 1-17-85, 1-18-85, 1-19-85, 1-26-85, 1-32-85, 1-33-85, 1-36-85, 1-37-85, 3-1-85, 3-2-85, 3-3-85, 3-5-85, 3-8-85, 3-10-85, 3-11-85, 3-13-85, 3-14-85, 3-15-85, 4-3-85, 6-7-85, 6-8-85, 6-10-85).

Se demostró la efectividad del uso conjunto de marcadores moleculares y citogenéticos en la identificación taxonómica de nuevas accesiones de naturaleza poliploide compleja y de origen desconocido, con vistas a su conservación y manejo en el mejoramiento genético.

## Recomendaciones

Utilizar los patrones moleculares de los fondos de diversidad y de los individuos para la identificación rápida y precisa de los materiales incluidos en la colección.

Utilizar de forma conjunta el polimorfismo RFLP citoplasmático y la amplificación mediante los cebadores específicos del gen del r-ADN 5S en la identificación de híbridos de origen desconocido y su empleo para el control de

cruces experimentales que incluyan progenitores incluidos en esta colección, en el marco del programa de nobilización de este cultivo en el país.

## Referencias

- Benzecri J.P. 1973. L'analyse des données. Tome II: L'analyse des correspondances- Dunod, Paris 619 pp.
- Berthaud J. 1997. Strategies for conservation of genetic resources in relation with their utilization. *Euphytica* 96, 1-12.
- Bonnierbale M.W., Beebe S., Tohme J. and Jones P.. 1997. Molecular genetic techniques in relation to sampling strategies and the development of core collections. In: (Eds. W. G. Ayad, Y. Hodkin, A. Jaradat & V. R. Rao) *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Report of an IPGRI Workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy. pp 98-102.
- Cornide M.T., Coto O., Calvo D., Canales E., Prada De F. and Pérez G. 2000. Molecular markers for the identification and assisted management of genetic resources for sugarcane breeding. *Plant Varieties and Seeds*, 13,113-123.
- Coto O. 2001. Caracterización e identificación molecular de clones del complejo *Saccharum* para la ampliación de la base genética del mejoramiento cañero en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH.
- Coto O., M. T. Cornide, D. Calvo, E. Canales, A. D'Hont y F. de Prada. 2002. Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with molecular markers. *Euphytica*, vol. 123, No.1, 121-130.
- D'Hont A, Ison D., Alix K., Roux C. and Glaszmann J.C. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of RNA genes. *Genome* 41:221-225.
- D'Hont A., Grivet L., Feldmann P., Rao S., Berding N. and Glaszmann J.C. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet.* 250: 405-413.
- D'Hont A., Rao P.S., Feldmann P., Grivet L., Islam-Faridi N., Taylor P. and Glaszmann J.C. 1995. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 91,320-326.
- Gallacher D.J. 1997. Optimised descriptors recommended for Australian sugarcane germplasm (*Saccharum* spp. hybrid). *Aust J. Agric. Res.*, 48, 775-779.
- Gallacher D.J. and Berding N. 1997. Purpose, selection, and application of descriptors for sugarcane germplasm. *Aust J. Agric. Res.*, 48, 759-767.
- Gepts P. 1995. Genetics markers and core collections. P. 127-146. In: T. Hodgkin, A.H.D. Brown, Th.J.L. van Hintum and E.A.V. Morales (eds), *Core collections of plant genetic resources*. Wiley, Chichester, UK.
- Heinz D.J. 1969. Isozyme prints for variety identification. *Sugarcane Breed Newsl* 24: 8.

- Hoisington D. 1992. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico, D.F. CIMMYT.
- IPGRI 1997. In: (Eds. W. G. Ayad, Y. Hodgkin, A. Jaradat & V. R. Rao) *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Report of an IPGRI Workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 134p.
- Pérez G.O., F. de Prada, A. Chinea, N. Bernal y J. O'Reilly. 1997. Recursos fitogenéticos de la caña de azúcar, INICA, Publicaciones IMAGO, 249 pp.
- Portieles R., R. Rodríguez, I. Hernández, E. Canales y M.T. Cornide. 2002. Determinación del número cromosómico de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y clones de fundación del complejo *Saccharum*. *Rev. Cultivos Tropicales*, Vol. 23 (2): 5-8.
- Portieles R., R. Rodríguez y M.T. Cornide. 2003. Cytogenetic characterization of new wild clones of the *Saccharum* complex. *Rev. Cultivos Tropicales* (en prensa)
- Rodríguez, R. y R. Portieles. 2003. Establecimiento de la técnica de Bando-C en clones silvestres del complejo *Saccharum*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 34, No. 3
- Sreenivasan, T.V; Ahloowalia, B.S. and Heinz, D.J. 1987. Cytogenetics. In: Heinz, D.J. (ed.). *Sugarcane Improvement Through Breeding*. Elsevier, Holland
- Tohme J., González D.O., Beebe S. and Duque M.C. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36, 1375-1384.