

Establecimiento de la técnica de Bando - C en clones silvestres del complejo *Saccharum*.

Raisa Rodríguez, Roxana Portieles

Dpto. Bioplantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana. Cuba.

Recibido: 16 de septiembre de 2002

Aceptado: 3 de diciembre del 2002

Palabras clave: complejo *Saccharum*, bando - C, cromosoma.

Key words: *Saccharum* complex, C - banding, chromosome.

RESUMEN: La caña de azúcar es un híbrido complejo de naturaleza autopoliploide que presenta cromosomas de pequeño tamaño (1 – 3 μm), lo que dificulta la identificación y la caracterización de los mismos. Hasta el momento los estudios sobre la estructura genómica y la evolución han estado basados en la distribución de los números cromosómicos y se desconoce el empleo de las técnicas de bando cromosómico que resultan de gran utilidad para la identificación de cromosomas individuales y para su empleo como marcadores citogenéticos. En este trabajo se ajustó la técnica de Bando -C con Giemsa a un grupo de clones silvestres del género *Erianthus*, probándose diferentes concentraciones de hidrólisis desde 0,05 N de HCl hasta 0,2 N y tiempos desde 0,5 min. hasta 2 min. Se ensayaron variantes de tiempo de tinción con Giemsa, que oscilaron desde los 15 min. hasta 1,5 horas. Finalmente, la concentración y el tiempo adecuados de hidrólisis resultaron de 0,1 N de HCl durante 1 min. y el tiempo de tinción en Giemsa de 1 hora. Se observaron bandas en las regiones centroméricas, intersticiales y combinaciones de bandas centroméricas con teloméricas y teloméricas con intersticiales que permitieron realizar la caracterización de los genotipos sobre la base de sus patrones de bando.

ABSTRACT: Sugarcane is a complex hybrid of autopolyploid nature with small chromosomes (1 – 3 μm), which difficult the chromosome identification and characterization. Up to now, studies on genome structure and evolution have been mainly based on the distribution of chromosome numbers and unknown the use of chromosome banding techniques, which are very useful for individual chromosome identification and as cytogenetic markers. Giemsa C - banding technique was established in new wild clones of *Erianthus* genus, testing different concentrations of hydrolysis from 0,05 N HCl to 0,2 N and times from 0,5 min. to 2 min. Variants of time in Giemsa stain were evaluated from 15 min. to 1,5 hours. At last, suitable hydrolysis concentration and time were resulted of 0,1 N HCl for 1 min., as well as time of Giemsa stain of 1 hour. Centromeric, interstitial bands and combinations of centromeric with telomeric and telomeric with interstitial were observed. These bands allowed to perform genotype characterization based on banding pattern.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de las técnicas que producen patrones de bando en los cromosomas es uno de los acontecimientos más significativos en la citogenética. Actualmente se encuentran disponibles una serie de técnicas de bando, de las cuales, la técnica de **Bando C** con Giemsa ha sido la más utilizada para identificar cromosomas individuales en muchas especies vegetales.¹ Esta técnica se basa en aplicar a las preparaciones cromosómicas diferentes pretratamientos y tinción con Giemsa.² Estos pretratamientos degradan el ADN cromosómico y lo extraen selectivamente de las partes eucromáticas del cromosoma, dejando que las zonas heterocromáticas se tiñan más intensamente con Giemsa. El nombre del Bando C se debe a que produce bandas constantes que corresponden a regiones de heterocromatina constitutiva que no se descondensan en interfase, siendo visibles tanto en mitosis como en interfase y de tamaño relativamente constante. Según los organismos pueden ser centroméricas, teloméricas o intersticiales.

Este método ha sido aplicado a especies de plantas con grandes cromosomas como trigo,^{3,4,5,6} centeno,^{7,8} cebada^{9,10} y triticale,^{11,12} permitiendo una identificación precisa de los cromosomas. En el caso de plan-

tas con cromosomas pequeños como arroz, *Arabidopsis* y *Brassica*, que miden de 1 a 2 μm en metafase mitótica, ha habido dificultades para identificar sus cromosomas por medios morfológicos.¹³ Los métodos de bandeo no han dado resultados para los cromosomas de soya y *Brassica* e incluso no han aparecido bandas en cromosomas de *Arabidopsis* y arroz.

La caña de azúcar se caracteriza por una alta poliploidía y una aneuploidía frecuente.¹⁴ Los cultivos modernos presentan cromosomas muy numerosos (100 – 130)¹⁵ y de pequeño tamaño (1 – 3 μm). Los estudios sobre la estructura genómica y la evolución han estado basados en la distribución de los números cromosómicos. Hasta el momento las técnicas de bandeo no se han empleado para la identificación taxonómica del complejo *Saccharum* y resultaría de suma importancia disponer de las mismas para este fin y para su empleo como marcadores citogenéticos.

El objetivo de este estudio es ajustar y aplicar la técnica de Bando-C con Giemsa, empleada en cromosomas de cereales, a un grupo de clones silvestres del complejo *Saccharum* colectados en Laos (Expedición Cuba - Laos, ECL) para lograr la identificación de sus cromosomas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios fueron realizados en los clones silvestres ECL 1 - 29, ECL 1 - 30, ECL 6 - 1, ECL 1 - 24, ECL 6 - 6, ECL 5 - 4 y ECL 1 - 31, pertene-

cientes al género *Erianthus*, procedentes del Banco de Germoplasma de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Matanzas (INICA).

Estos clones fueron colectados en el Sudeste Asiático¹⁶, por constituir un centro de diversificación importante de estas especies, con el objetivo de ampliar la base genética del programa cubano. Los cultivares comerciales de caña de azúcar presentan como limitante una estrecha base genética por lo que se hace necesario emplear otras fuentes genéticas disponibles entre las que se encuentran las especies del género *Erianthus*. Estos clones fueron identificados taxonómicamente mediante marcadores moleculares (RFLP y cebadores específicos)¹⁷ y fueron escogidos por constituir un material de fácil manipulación, ya que su número cromosómico no excede los 40 cromosomas.¹⁸

Se tomaron muestras de tallos de plantones escogidos al azar y de los entrenudos de los tercios medio e inferior. Los ápices radiculares fueron pretratados con 8 - hidroxiquinolina al 0,002 % durante 3 horas y fijados en etanol - ácido acético (3:1) por 24 horas.

El procedimiento para realizar el Bando-C fue tomado del reportado para cereales.¹¹ Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico Olympus Vanox - T con cámara fotográfica acoplada, fotografiando las mejores placas metafásicas sin cromosomas superpuestos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El punto de partida para lograr resultados satisfactorios en el bandeo es obtener buenas preparaciones del material fijado, con células que presenten cromosomas bien extendidos durante la prometafase mitótica. Estas preparaciones se realizaron después de la fijación de los ápices radiculares mediante el aplastamiento con ácido acético al 45%. Posteriormente, se separaron el porta y cubreobjetos con nitrógeno líquido y se introdujeron en etanol absoluto por 24 horas.

Durante la hidrólisis fue necesario ajustar la concentración y el tiempo de las preparaciones en la solución de ácido clorhídrico, probándose concentraciones desde 0,05 N hasta 0,2 N y tiempos desde 0,5 min. hasta 2 min. en los clones ECL 1-29 y ECL 1-30. En la figura 1a se observan los cromosomas del clon ECL 1 - 29 muy oscuros debido a tiempos y concentraciones insuficientes de hidrólisis (0,05 N durante 0,5 min.), condiciones que no permiten una diferenciación adecuada de las bandas dentro de los cromosomas. En el caso de concentraciones y tiempos de 0,2 N durante 2 min. no se pudieron observar cromosomas, lo cual puede deberse a la pérdida de gran cantidad de ADN, producto de la elevada concentración del ácido clorhídrico.¹¹ Sin embargo, con concentraciones de 0,1 N a 60°C y tiempos de 1 min. se pudieron diferenciar de manera precisa las regiones de heterocromatina constitutiva dentro de los cromosomas (Fig. 1b).

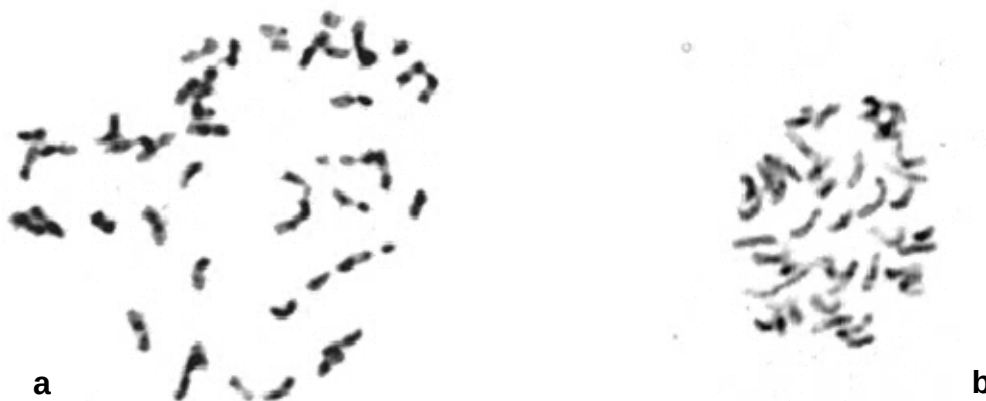


Fig. 1. Bando - C, prometafase somática del clon silvestre ECL 1 - 29 ($2n = 40$) con 0,5 N HCl por 0,5 min. (a) y 0,1 N HCl por 1 min. (b), x 220.

Seguidamente, los portaobjetos se sometieron a un tratamiento alcalino en solución saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a temperatura ambiente durante 7 min. con el objetivo de desnaturalizar el ADN y a un tratamiento con una solución salina de citrato de sodio 2 x SSC a 60°C durante 1 hora para renaturalizar el mismo. La tinción se llevó a efecto introdu-

ciendo los portaobjetos en una solución de Giemsa al 2,5 % en tampón fosfato a $\text{pH}=7$. El tiempo de tinción fue establecido luego de ensayar con diferentes variantes que oscilaron desde los 15 min. hasta 1,5 horas. La figura 2a muestra una célula del clon ECL 1 - 30 sometida a un tiempo intermedio de 30 min., donde se pueden diferenciar las bandas dentro

de los cromosomas, aunque aún se encuentran poco nítidas. En la figura 2b se observan cromosomas pertenecientes al mismo clon sometidos a una hora en la solución de Giemsa, constituyendo éste el punto máximo para obtener el contraste necesario. Por encima de este tiempo se observó una sobretinción y no se diferenciaron las bandas.

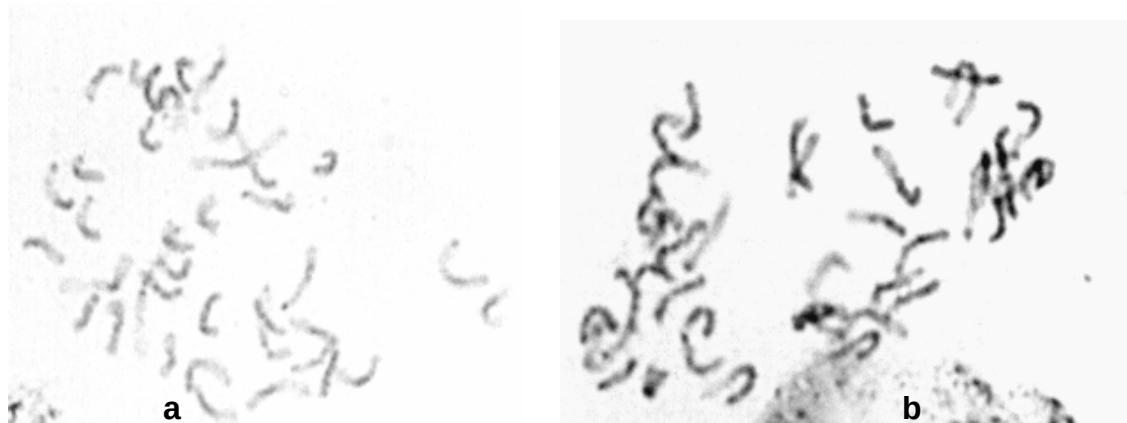


Fig. 2. Clon ECL 1 - 30 con cromosomas sometidos a 30 min. de tinción (a), cromosomas con 1 hora de tinción (b).

Posteriormente, se lavaron los portaobjetos con agua corriente, se secaron y sellaron las muestras con Bálsamo de Canadá.

Una vez ajustada la técnica, ésta

se aplicó al resto de los clones mencionados anteriormente. En los clones estudiados se pudo observar la presencia de bandas en diferentes regiones a lo largo del cromosoma:

centroméricas (I), intersticiales (IV) y combinaciones de bandas centroméricas y teloméricas (II) y teloméricas e intersticiales (III) (Figuras 3a y 3b).

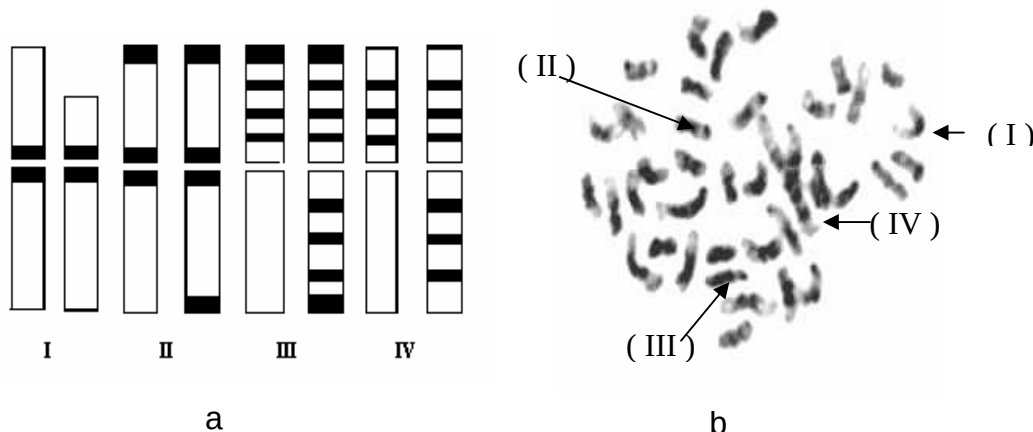


Fig. 3. Representación esquemática de las bandas del género *Erianthus* (a). Clon ECL 6 - 6 ($2n = 40$) con cromosomas bandeados (b) x 400.

- I: Bandas centroméricas
- II: Combinaciones de bandas centroméricas y teloméricas
- III: Combinaciones de bandas teloméricas e intersticiales
- IV: Bandas intersticiales

Se debe señalar que en las combinaciones de bandas centroméricas y teloméricas (II) y teloméricas e intersticiales (III), las bandas teloméricas aparecieron en un solo bra-

zo o en ambos brazos del cromosoma. Lo mismo ocurrió en los cromosomas que presentaron bandas intersticiales solamente (IV). Las bandas intersticiales (IV) y la combina-

ción de teloméricas e intersticiales (III) fueron más frecuentes en los cromosomas de mayor longitud. No se apreciaron bandas en las regiones sólo teloméricas.

CONCLUSIONES

Se logró establecer la técnica de Bando-C con Giemsa en clones silvestres del género *Erianthus*, pertenecientes al complejo *Saccharum*.

La concentración y el tiempo adecuados de hidrólisis resultaron de 0,1 N de ácido clorhídrico durante 1 minuto y el tiempo de tinción con Giemsa de 1 hora.

Se pudieron observar bandas en las regiones centroméricas (I), intersticiales (IV) y combinaciones de bandas centroméricas y teloméricas (II) y teloméricas e intersticiales (III) en todos los clones estudiados, lo que pudiera considerarse como característica del género *Erianthus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lacadena J.R. Citogenética. Ed. Complutense S. A., España, 1996.
2. Priest J.H. Banding procedures and special stains. In The Cytogenetic Symposia, B.J. Kaplan and K. S. Dale, Eds., The Association of Cytogenetic Technologists, Burbank, California, 1994.
3. Linde-Laursen I., Frederiksen S. Giemsa C-banded karyotypes of three subspecies of *Taeniatherum caput – medusae* and of two intergeneric hybrids with *Psathyrostachys* spp. (Poaceae). **Hereditas**, **110**, 283, 1989.
4. Linde-Laursen I., Frederiksen S. Comparison of the Giemsa C-banded karyotypes of *Dasyphyrum villosum* (2x) and *D. brevistaratum* (4x) from Greece. **Hereditas**, **114**, 237, 1991.
5. Linde-Laursen I., Von Bothmer R., and Jacobsen N. Relationships in the genus *Hordeum*: Giemsa C – banded karyotypes. **Hereditas**, **116**, 111, 1992.
6. Friebe B. and Gill B. S. Chromosome banding and genome analysis in diploid and cultivated polyploid wheats, Chapter 3. In Methods of Genome Analysis in Plants. CRC Press. Inc. 39 – 60, 1996.
7. Naranjo T. Preferential occurrence of Wheat – Rye Meiotic Pairing between Chromosomes of homoeologous Group 1. **Theor Appl Genet**, **63**, 219, 1982.
8. Naranjo T. and Lacadena J.R. C-Banding Pattern and Meiotic Pairing in Five Rye Chromosomes of Hexaploid Triticale. **Theor Appl Genet**, **61**, 233, 1982.
9. Linde-Laursen I., Von Bothmer R., and Jacobsen N. Giemsa C-banded karyotypes of *Hordeum marinum* and *H. murinum*. **Genome**, **32**, 629, 1989.
10. Jorgensen R.B. and Andersen B. Karyotype analysis of regenerated plants from callus cultures of interespecific hybrids of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor Appl Genet**, **77**, 343, 1989.
11. Naranjo T. Identificación de los cromosomas de trigo del triticales “Cachirulo” por homología con los de *Triticum aestivum*. **An Aula Dei**, **19**, 55, 1988.
12. Taketa S., Nakazaki T., Schwarzacher T. and Heslop-Harrison J. S. Detection of a 4 DL chromosome segment translocated to rye chromosome 5R in an advanced hexaploid triticales line Bronco 90. **Euphytica**, **97**, 91, 1997.
13. Ohmido N., Akiyama Y. and Fukui K. Physical mapping of unique nucleotide sequences on identified rice chromosomes. **Plant Molecular Biology**, **138**, 1043, 1998.
14. Glaszmann J.C. y D’ Hont A. Análisis molecular de la biodiversidad del germoplasma en caña de azúcar. En Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. Ed., A. Arencibia y M. T. Cornide, Elfos Scientiae, Cuba, 25-44, 1999.
15. Sreenivasan T. V., Ahloowalia B. S. and Heinz D. J. Cytogenetics. In Sugarcane Improvement through Breeding, D. J. Heinz Ed., Elsevier, Holland, 211-253, 1987.
16. China A. y Morales F. Colecta de germoplasma de caña de azúcar en la R.D.P. Laos. VII Conf. Provincial de la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba (ATAC), Matanzas, Cuba, 1-10, 1987.
17. Coto O., Cornide M. T., Calvo D., Canales E., D’ Hont A. and Prada F. Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with markers. **Euphytica**, **123**, 121, 2002.
18. Portieles R., Rodríguez R., Hernández I., Canales E. y Cornide M. T. Determinación del número cromosómico de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y de clones de fundación del complejo *Saccharum*. **Cultivos Tropicales** **23** (2), 5, 2002.