

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN GERMOPLASMA DE CAÑA DE AZÚCAR UTILIZANDO MARCADORES TIPO MICROSATÉLITE

**Luis Molina¹, José Luis Quemé², Carlos Maddaleno¹,
Victoriano Sut¹, Pablo Camargo¹
¹Área de Biotecnología CENGICAÑA, ²Área
Fitomejoramiento CENGICAÑA**

RESUMEN

Los marcadores tipo microsatélite CV29, CV37 y CV38 resultaron útiles para iniciar la evaluación de la diversidad genética de 204 variedades de caña de azúcar de la colección de germoplasma de la Agroindustria Azucarera de Guatemala. Se obtuvo un coeficiente de diversidad promedio (heterocigosidad) de 0.37. El rango de variación en la similitud genética de la población fue de 0.50-0.90. Este resultado es de interés pues indica la existencia de variabilidad, teniendo en cuenta que el 73.04 % de las variedades tienen la misma procedencia (Canal Point, Estados Unidos). Tomando 0.63 como coeficiente máximo de similitud se obtuvieron 20 grupos que se pueden usar como referencia en la planificación de cruces.

ABSTRACT

The CV29, CV37 and CV38 microsatellite markers were useful to start evaluating the genetic diversity on 204 varieties from sugarcane germplasm collection of Sugar Agro Industry of Guatemala. Heterozygosity coefficient of 0.37 was obtained. The range of variation in the genetic similarity of the population was 0.50 to 0.90. This result is of interest because it indicates the existence of variability, taking into account that 73.04% of the varieties have the same origin (Canal Point, USA). Taking 0.63 as maximum similarity coefficient, varieties gathered in 20 groups that can be used as a reference in planning crosses.

INTRODUCCIÓN

En Guatemala, el Programa de Variedades de CENGICAÑA realiza el mejoramiento genético de la caña de azúcar enfocado a contribuir al incremento de la productividad de azúcar. Para ello se pretende generar y/o adaptar variedades de alto tonelaje de caña y rendimiento de azúcar, a las diferentes condiciones ambientales, y que a su vez muestren resistencia a las enfermedades y las plagas más comunes. El programa inició sus actividades en 1992 y fue establecido con una estrategia general que contempla tres componentes principales: a) estudios de variabilidad genética (germoplasma y cruzamientos), b) evaluación y selección de germoplasma y c) liberación de variedades nuevas (Orozco *et al.*, 2012).

La variabilidad genética es un factor necesario en un programa de mejora genética. La caracterización de la variabilidad puede facilitar su uso y conservación, esta caracterización puede hacerse con base en características fenotípicas o genotípicas. Las características fenotípicas tienen la desventaja de que pueden variar a través de ambientes diferentes, lo que no sucede con las características genotípicas que se obtienen mediante marcadores moleculares.

Roughan *et al.*, (1971) reportaron por primera vez el uso de marcadores moleculares en caña de azúcar. Analizando

la variación de la isoenzima β -amilasa en *S. officinarum*, *S. spontaneum* y la progenie F₁ originada de su cruzamiento, fueron capaces de diferenciar los genotipos de cada una de las dos especies, así como los de la progenie híbrida y la resultante de autofecundación, aunque no encontraron ninguna correlación entre los marcadores y el contenido de almidón en el tallo de la planta.

Actualmente los marcadores más utilizados son los de ADN. Estos pueden obtenerse por 1) restricción de fragmentos 2) amplificación de fragmentos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los marcadores moleculares se han utilizado en caña de azúcar con varios propósitos, como comprender el origen de los cultivares comerciales, determinar la diversidad genética, identificación de variedades, identificación de loci de características cuantitativas (QTL), análisis genómico funcional y estructural y diagnóstico de patógenos (Lackshmanan *et al.*, 2005).

La determinación de la diversidad genética entre cultivares es potencialmente una herramienta importante para propósitos de fitomejoramiento, puesto que puede proveer a los fitomejoradores los medios para analizar la variación disponible en colecciones de germoplasma. Esta diversidad da a los mejoradores de caña de azúcar la oportunidad de seleccionar germoplasma más diverso para incluir dentro de sus programas de mejoramiento (Aitken y McNeil, 2010).

El análisis de los patrones moleculares permite establecer el grado de similitud entre las variedades, lo que permite visualizar los niveles de diversidad genética con que se cuenta en las colecciones y en los programas de mejoramiento (Aitken y McNeil, 2010). El análisis de marcadores moleculares ofrece una medida de las relaciones genéticas con base en características del ADN (Singh *et al.*, 2010). Esa información se convierte en una herramienta para la planificación de las hibridaciones.

Para datos de marcadores moleculares, se calculan las frecuencias alélicas y se usan para construir una matriz binaria para análisis estadístico. Las medidas de distancia o similitud genética más comúnmente utilizadas con datos binarios para calcular la diversidad genética son el coeficiente de Nei y Li y el coeficiente de Jaccard. Alternativamente, técnicas de análisis multivariado, las cuales analizan simultáneamente múltiples mediciones en cada individuo bajo investigación se utilizan ampliamente para el análisis de la diversidad genética, indistintamente del conjunto de datos (morfológicos, bioquímicos o moleculares). Dentro de estos algoritmos, el análisis de conglomerados que utiliza el método jerárquico aglomerativo UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages por sus siglas en inglés), el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de coordenadas principales son, actualmente, los más comúnmente utilizados y particularmente útiles (Aitken y McNeil, 2010).

En 2005, el programa de mejoramiento genético de caña de azúcar en Guatemala realizó una primera caracterización de germoplasma mediante microsatélites (Quemé, Molina, Melgar, 2005) y actualmente, su uso aporta información a la planificación de las cruzas.

Maccheroni *et al.* (2007) reportaron la utilización de tres marcadores microsatélite derivados del análisis de secuencias EST para discriminar variedades de caña de azúcar, identificar accesiones duplicadas en el banco de germoplasma, determinar índices de similitud entre variedades que ayude a

seleccionar progenitores para cruzamientos, e identificación de progenitores masculinos en policruzas. Por otra parte, con base en la secuenciación de clones de dos bibliotecas genómicas, Parida *et al.* (2008) reportaron el desarrollo de 1.315 marcadores microsatélite a los que denominaron SEGMS (Sugarcane Enriched Genomic MicroSatellite).

OBJETIVO

Analizar la variabilidad en 204 variedades de caña de azúcar utilizando marcadores tipo microsatélite.

METODOLOGÍA

Material vegetal

En este estudio se utilizaron 204 variedades de caña de azúcar (Cuadro 1), provenientes de la Colección de Germoplasma de la Agro Industria Azucarera de Guatemala (AIAG).

Cuadro 1. Nombre y procedencia de los genotipos caracterizados mediante marcadores microsatélite

No.	Variedad*	Origen	No.	Variedad	Origen
1	Akoki	EUA	26	CP00-1071	Canal Point (EUA)
2	B4744	Barbados	27	CP00-1100	Canal Point (EUA)
3	B73375	Barbados	28	CP00-1101	Canal Point (EUA)
4	BA11569	Barbados	29	CP00-1359	Canal Point (EUA)
5	BJ5732	Barbados	30	CP00-1570	Canal Point (EUA)
6	CB40-35	Campus (Brasil)	31	CP00-1607	Canal Point (EUA)
7	CC85-92	Cengicaña (Colombia)	32	CP00-1675	Canal Point (EUA)
8	CG00-033	Cengicaña (Guatemala)	33	CP00-1683	Canal Point (EUA)
9	CG00-102	Cengicaña (Guatemala)	34	CP00-1748	Canal Point (EUA)
10	CG00-111	Cengicaña (Guatemala)	35	CP00-1749	Canal Point (EUA)
11	CG00-129	Cengicaña (Guatemala)	36	CP00-1751	Canal Point (EUA)
12	CG01-27	Cengicaña (Guatemala)	37	CP00-1758	Canal Point (EUA)
13	CG01-53	Cengicaña (Guatemala)	38	CP00-1763	Canal Point (EUA)
14	CG01-60	Cengicaña (Guatemala)	39	CP00-1803	Canal Point (EUA)
15	CG02-163	Cengicaña (Guatemala)	40	CP00-1810	Canal Point (EUA)
16	CG03-025	Cengicaña (Guatemala)	41	CP00-1825	Canal Point (EUA)
17	CG03-114	Cengicaña (Guatemala)	42	CP00-1830	Canal Point (EUA)
18	CG03-240	Cengicaña (Guatemala)	43	CP00-2164	Canal Point (EUA)
19	CG03-242	Cengicaña (Guatemala)	44	CP00-2180	Canal Point (EUA)
20	CG97-97	Cengicaña (Guatemala)	45	CP00-7753	Canal Point (EUA)
21	CG98-10	Cengicaña (Guatemala)	46	CP01-1262	Canal Point (EUA)
22	CG98-46	Cengicaña (Guatemala)	47	CP01-1338	Canal Point (EUA)
23	CG98-78	Cengicaña (Guatemala)	48	CP01-1372	Canal Point (EUA)
24	CG99-099	Cengicaña (Guatemala)	49	CP01-1449	Canal Point (EUA)
25	Co421	Coimbatore (India)	50	CP01-1614	Canal Point (EUA)

*De manera general, las variedades de caña de azúcar se nombran con las iniciales de su origen geográfico, seguido por dos números separados por un guión, el primero de ellos indica el año en que esa variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección.

...Continuación Cuadro 1

No.	Variedad*	Origen	No.	Variedad	Origen
51	CP01-1750	Canal Point (EUA)	96	CP53-6	Canal Point (EUA)
52	CP01-1779	Canal Point (EUA)	97	CP66-346	Canal Point (EUA)
53	CP01-1802	Canal Point (EUA)	98	CP67-42	Canal Point (EUA)
54	CP01-2471	Canal Point (EUA)	99	CP70-321	Canal Point (EUA)
55	CP01-2634	Canal Point (EUA)	100	CP72-2086	Canal Point (EUA)
56	CP02-1003	Canal Point (EUA)	101	CP73-1547	Canal Point (EUA)
57	CP02-1049	Canal Point (EUA)	102	CP75-1082	Canal Point (EUA)
58	CP02-1050	Canal Point (EUA)	103	CP75-1553	Canal Point (EUA)
59	CP02-1120	Canal Point (EUA)	104	CP75-1632	Canal Point (EUA)
60	CP02-1124	Canal Point (EUA)	105	CP76-328	Canal Point (EUA)
61	CP02-1255	Canal Point (EUA)	106	CP77-1055	Canal Point (EUA)
62	CP02-1345	Canal Point (EUA)	107	CP78-1247	Canal Point (EUA)
63	CP02-1593	Canal Point (EUA)	108	CP78-1628	Canal Point (EUA)
64	CP02-1668	Canal Point (EUA)	109	CP79-332	Canal Point (EUA)
65	CP02-1703	Canal Point (EUA)	110	CP80-1743	Canal Point (EUA)
66	CP02-1756	Canal Point (EUA)	111	CP80-1752	Canal Point (EUA)
67	CP02-1769	Canal Point (EUA)	112	CP80-1827	Canal Point (EUA)
68	CP02-1784	Canal Point (EUA)	113	CP81-1335	Canal Point (EUA)
69	CP02-1807	Canal Point (EUA)	114	CP81-1383	Canal Point (EUA)
70	CP02-1840	Canal Point (EUA)	115	CP82-2043	Canal Point (EUA)
71	CP02-1915	Canal Point (EUA)	116	CP85-1482	Canal Point (EUA)
72	CP02-1966	Canal Point (EUA)	117	CP86-1209	Canal Point (EUA)
73	CP02-1969	Canal Point (EUA)	118	CP86-1614	Canal Point (EUA)
74	CP02-2113	Canal Point (EUA)	119	CP86-1623	Canal Point (EUA)
75	CP02-2584	Canal Point (EUA)	120	CP86-1633	Canal Point (EUA)
76	CP03-1002	Canal Point (EUA)	121	CP86-1664	Canal Point (EUA)
77	CP03-1103	Canal Point (EUA)	122	CP86-1705	Canal Point (EUA)
78	CP03-1494	Canal Point (EUA)	123	CP86-1747	Canal Point (EUA)
79	CP03-1553	Canal Point (EUA)	124	CP86-2024	Canal Point (EUA)
80	CP03-1585	Canal Point (EUA)	125	CP87-1141	Canal Point (EUA)
81	CP03-1594	Canal Point (EUA)	126	CP87-1500	Canal Point (EUA)
82	CP03-1646	Canal Point (EUA)	127	CP88-1165	Canal Point (EUA)
83	CP03-1660	Canal Point (EUA)	128	CP88-1179	Canal Point (EUA)
84	CP03-1688	Canal Point (EUA)	129	CP88-1532	Canal Point (EUA)
85	CP03-1724	Canal Point (EUA)	130	CP88-1696	Canal Point (EUA)
86	CP03-2212	Canal Point (EUA)	131	CP88-1700	Canal Point (EUA)
87	CP04-1067	Canal Point (EUA)	132	CP88-1726	Canal Point (EUA)
88	CP04-119	Canal Point (EUA)	133	CP88-1912	Canal Point (EUA)
89	CP04-1510	Canal Point (EUA)	134	CP88-2017	Canal Point (EUA)
90	CP04-2076	Canal Point (EUA)	135	CP89-1288	Canal Point (EUA)
91	CP04-2115	Canal Point (EUA)	136	CP89-1325	Canal Point (EUA)
92	CP27-139	Canal Point (EUA)	137	CP89-1327	Canal Point (EUA)
93	CP29-126	Canal Point (EUA)	138	CP89-1344	Canal Point (EUA)
94	CP48-103	Canal Point (EUA)	139	CP89-1417	Canal Point (EUA)
95	CP52-43	Canal Point (EUA)	140	CP89-1431	Canal Point (EUA)

*De manera general, las variedades de caña de azúcar se nombran con las iniciales de su origen geográfico, seguido por dos números separados por un guión, el primero de ellos indica el año en que esa variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección.

...Continuación Cuadro 1.

No.	Varietad*	Origen	No.	Varietad	Origen
141	CP89-1436	Canal Point (EUA)	173	CPCL02-2584	Canal Point-Clewiston (EUA)
142	CP89-1528	Canal Point (EUA)	174	CPCL05-1504	Canal Point-Clewiston (EUA)
143	CP89-1538	Canal Point (EUA)	175	HoCP02-639	Houma-Canal Point (EUA)
144	CP89-1551	Canal Point (EUA)	176	L77-40	Luisiana (EUA)
145	CP89-1606	Canal Point (EUA)	177	Mex53-142	Mexico
146	CP89-1632	Canal Point (EUA)	178	Mex58-326	Mexico
147	CP89-2143	Canal Point (EUA)	179	Mex60-445	Mexico
148	CP90-1204	Canal Point (EUA)	180	Mex60-676	Mexico
149	CP90-1222	Canal Point (EUA)	181	Mex68-2243	Mexico
150	CP90-1294	Canal Point (EUA)	182	Mex73-523	Mexico
151	CP91-1450	Canal Point (EUA)	183	Mex75-1705	Mexico
152	CP91-1560	Canal Point (EUA)	184	Mex79-431	Mexico
153	CP91-1564	Canal Point (EUA)	185	NA56-75	Norte de Argentina
154	CP91-1941	Canal Point (EUA)	186	POJ2714	Proefstation Oost Java (Indonesia)
155	CP91-2087	Canal Point (EUA)	187	POJ2878	Proefstation Oost Java (Indonesia)
156	CP92-1185	Canal Point (EUA)	188	PR71-358	Puerto Rico
157	CP92-1682	Canal Point (EUA)	189	PR77-3031	Puerto Rico
158	CP92-1780	Canal Point (EUA)	190	PR83-2046	Puerto Rico
159	CP93-1056	Canal Point (EUA)	191	PR87-2004	Puerto Rico
160	CP94-1182	Canal Point (EUA)	192	PR87-2015	Puerto Rico
161	CP96-1068	Canal Point (EUA)	193	PR87-3025	Puerto Rico
162	CP96-1093	Canal Point (EUA)	194	PR99-7	Puerto Rico
163	CP96-1120	Canal Point (EUA)	195	Q124	Queensland (Australia)
164	CP96-1552	Canal Point (EUA)	196	R570	Reunion
165	CP97-1931	Canal Point (EUA)	197	RB845210	República de Brasil
166	CP98-1029	Canal Point (EUA)	198	San Felipe	Origen desconocido
167	CP99-1944	Canal Point (EUA)	199	SP70-4768	Sao Paulo (Brasil)
168	CP99-1989	Canal Point (EUA)	200	SP71-6161	Sao Paulo (Brasil)
169	CPCL00-6131	Canal Point-Clewiston (EUA)	201	SP79-1287	Sao Paulo (Brasil)
170	CPCL02-0878	Canal Point-Clewiston (EUA)	202	SP79-2233	Sao Paulo (Brasil)
171	CPCL02-1546	Canal Point-Clewiston (EUA)	203	SP80-1842	Sao Paulo (Brasil)
172	CPCL02-2186	Canal Point-Clewiston (EUA)	204	SP81-3250	Sao Paulo (Brasil)

*De manera general, las variedades de caña de azúcar se nombran con las iniciales de su origen geográfico, seguido por dos números separados por un guión, el primero de ellos indica el año en que esa variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección.

En este trabajo se incluyeron siete variedades en duplicado que se utilizaron para verificar la uniformidad en el proceso de amplificación, electroforesis y tinción de bandas. Se esperaba que en el análisis de similitud estas variedades agruparan por pares con sus duplicados con un coeficiente de similitud igual a 1. Las variedades control

fueron: CP72-2086, CP00-1607, CP00-1071, CP00-1100, CP00-2180, CP00-1570 y CP73-1547.

Extracción de ADN

El procedimiento utilizado para la extracción de ADN se basó en el trabajo de Hoisington *et al.* (1994) con algunas modificaciones menores. Se tomaron aproximadamente 150 mg de material vegetal y se maceraron con nitrógeno líquido dentro de un tubo de 2.5 ml, al que se le agregó 600 µl de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) precalentado a 65°C y se dejó en baño de

María a 65°C durante 30 minutos mezclando ocasionalmente, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se agregaron 500 µl de una solución de cloroformo:alcoholisoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó a un tubo nuevo en donde se le agregaron 15 µl de ARNasa (10 mg/ml) y se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente, se repitió el lavado con cloroformo:alcohol isoamílico y se recuperó nuevamente el sobrenadante. Por último se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol frío y 1/10 de acetato de amonio para precipitar los ácidos nucleicos, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos hasta formar un pellet que posteriormente se lavó con alcohol etílico al 70 % y se dejó secar sobre la mesa, una vez seco se resuspendió en 100 µl de agua para PCR y se almacenó a 4°C.

Cuantificación del ADN extraído

De cada muestra se tomaron 5 µl del ADN extraído y se diluyeron en 2,995 µl de agua ultrapura. Utilizando una cubeta de cuarzo, a esta dilución se le midió la absorbancia de luz a 260 nm y 280 nm de longitud de onda y para calcular la concentración de ADN se utilizó la siguiente relación:

$$\mu\text{g/ml ADN} = (\text{abs}_{260} \text{ medida}) * (50\mu\text{g/ml}) * (\text{factor de dilución})$$

La pureza de la solución de ADN se determinó obteniendo la razón de absorbancia 260 nm/280 nm. Se consideró adecuada la pureza de la solución cuando esta razón estuvo en el rango entre 1.7 y 1.9.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron tres pares de iniciadores (Cuadro 2) reportados por Maccheroni *et al.* (2007) que amplifican secuencias microsatélite.

Cuadro 2. Identificación y características de los iniciadores utilizados

Identificación	Secuencia	Rango de amplificación (bp)	Motivo	Temperatura Anillamiento (°C)
CV29r	5'-GCG TGC ATC GCT TGT GTC TT -3'	85-151	(ATCT)	64
CV29f	5'-TCG CGT CCA CCA ATG TAA CC -3'			
CV37r	5'-ATA AAG TGG CCG CTT GGA TTG A -3'	114-171	(TTTC)	
CV37f	5'-GGA TGG ACG ACG TGT CCT GG -3'			
CV38r	5'-GTC AAA CAG GCG ATC TGG CTC-3'	93-238	(CTTTT)	
CV38f	5'-GAA GCA GGG GCC TCA AGT TG -3'			

Fuente: Maccheroni *et al.* (2007)

El volumen total de la reacción fue de 10 µl. Se utilizaron 8.6 µl de Master Mix Amplitaq Gold 360 de Applied Biosystems, 0,2 µl de cada iniciador a una concentración de 10.0 µM y 1 µl de ADN (25 ng).

Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción

La electroforesis se realizó en una cámara MiniProtean TetraCell (Bio-Rad) y los geles se prepararon con una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 37.5:1 (40 %), TBE 5X, agua destilada, temed y APS. Las cámaras se llenaron con TBE1X y se aplicaron 110 voltios durante 90 minutos.

Los geles de poliacrilamida se separaron de los vidrios tras la electroforesis y, la tinción de las bandas de ADN se realizó de la siguiente manera: fijación por 20 minutos con ácido acético 10 %, tres lavados de 2 minutos con agua destilada, tinción con nitrato de plata (AgNO₃ 0.1 % p/v, formaldehído 0.15 % v/v) durante 30 minutos, un lavado con agua destilada de 10 segundos, revelado con una solución fría de carbonato de sodio (NaCO₃ 3 % p/v, formaldehído 0.15 %, tiosulfato de sodio 0.00052 %) hasta la aparición de bandas definidas y, finalmente, la detención de la reacción de revelado con ácido acético al 10 %.

Análisis de los datos

Los datos de presencia/ausencia de bandas fueron utilizados para cuantificar la similitud genética utilizando el coeficiente de Dice ($S_{a,b}$).

$$S_{a,b} = 2N / (2N + n_a + n_b)$$

Donde $S_{a,b}$ es el coeficiente de la similitud que existe entre los genotipos a y b ; N es el total de coincidencia positiva entre los genotipos a y b ; n_a y n_b son el total de bandas no coincidentes presentes en cada genotipo a y b , respectivamente (Harvey and Botha, 1996). Los resultados del coeficiente de Dice fueron utilizados para generar una matriz de similitud, la cual fue interpretada gráficamente a través del método de agrupamiento UPGMA,

utilizando el software NTSYSpc (Rohlf, 2003).

RESULTADOS

Se realizó el análisis de 204 variedades procedentes de Argentina, Australia, Barbados, Brasil, Estados Unidos, Guatemala, India, Indonesia, México, Puerto Rico y Reunión. Los tres marcadores utilizados amplificaron fragmentos que en su mayoría se mostraron polimórficos, originando distintos patrones de bandas en las variedades como puede observarse en la Figura 1 donde se muestra la separación de los productos amplificados en siete variedades para los tres marcadores tras la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y la tinción con plata.

El rango de tamaños de los fragmentos obtenidos para el marcador CV29 fue de 88-910 pb; para CV37 de 101-1269 pb y para CV38 entre 120-1010 pb. En comparación con los resultados obtenidos por Maccheroni *et al.* (2007), quienes obtuvieron bandas en un rango de 102-199 pb, observamos que hemos amplificado bandas dentro y fuera de este rango, siendo estas últimas inespecíficas. De estos resultaron polimórficos 18 en los primeros marcadores y 12 en CV38 (Cuadro 3). En este cuadro también se muestran las frecuencias alélicas obtenidas para cada locus.

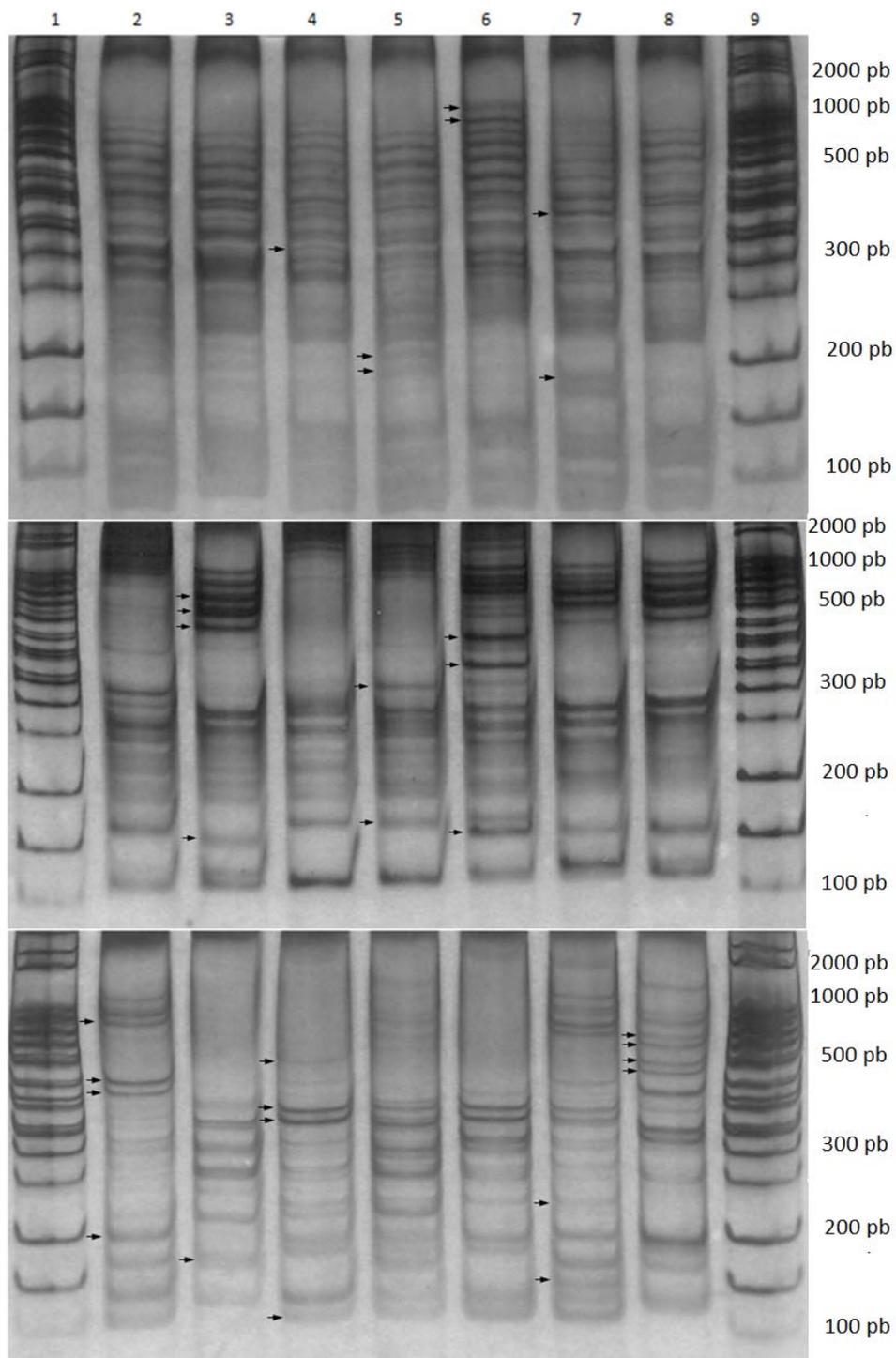


Figura 1. Bandas de ADN amplificadas con el marcador CV29 (arriba), CV37 (centro) y CV38 (abajo) en 7 variedades. Las flechas muestran algunas bandas polimórficas. Carriles: 1=marcador de masa molecular, 2=CP00-1763, 3=CP86-1705, 4=CP01-1750, 5=CP86-1747, 6=CP03-2212, 7=CP29-126, 8=CP00-1748, 9=marcador de masa molecular

Cuadro 3. Número de bandas y frecuencias génicas de los alelos: ausencia de banda (0) y presencia (1) . Bandas obtenidas mediante la utilización de los pares de iniciadores CV29, CV37 y CV38 en una población de 204 variedades de caña de azúcar

No.	Locus	Tamaño	na*	ne*	h*	No.	Locus	Tamaño	na*	ne*	h*
1	CV29-1	204	1	1.0000	0.0000	30	CV37-9	204	2	1.5334	0.3478
2	CV29-2	204	1	1.0000	0.0000	31	CV37-10	204	2	1.5176	0.3411
3	CV29-3	204	2	1.9912	0.4978	32	CV37-11	204	2	1.3885	0.2798
4	CV29-4	204	2	1.8967	0.4728	33	CV37-12	204	2	1.8433	0.4575
5	CV29-5	204	2	1.8230	0.4515	34	CV37-13	204	2	1.9342	0.4830
6	CV29-6	204	2	1.9969	0.4992	35	CV37-14	204	2	1.4556	0.3130
7	CV29-7	204	2	1.9169	0.4783	36	CV37-15	204	2	1.7603	0.4319
8	CV29-8	204	2	1.7828	0.4391	37	CV37-16	204	2	1.9640	0.4908
9	CV29-9	204	2	1.6868	0.4072	38	CV37-17	204	2	1.9286	0.4815
10	CV29-10	204	2	1.4863	0.3272	39	CV37-18	204	2	1.8211	0.4509
11	CV29-11	204	2	1.8716	0.4657	40	CV37-19	204	1	1.0000	0.0000
12	CV29-12	204	2	1.4709	0.3201	41	CV38-1	204	1	1.0000	0.0000
13	CV29-13	204	2	1.4941	0.3307	42	CV38-2	204	1	1.0000	0.0000
14	CV29-14	204	2	1.7592	0.4316	43	CV38-3	204	1	1.0000	0.0000
15	CV29-15	204	2	1.9046	0.4750	44	CV38-4	204	2	1.8852	0.4695
16	CV29-16	204	2	1.7273	0.4211	45	CV38-5	204	2	1.8983	0.4732
17	CV29-17	204	2	1.5176	0.3411	46	CV38-6	204	2	1.9046	0.4750
18	CV29-18	204	2	1.5019	0.3342	47	CV38-7	204	2	1.9595	0.4897
19	CV29-19	204	2	1.9549	0.4885	48	CV38-8	204	2	1.8918	0.4714
20	CV29-20	204	1	1.0000	0.0000	49	CV38-9	204	2	1.8286	0.4531
21	CV29-21	204	2	1.9046	0.4750	50	CV38-10	204	2	1.5019	0.3342
22	CV37-1	204	2	1.7031	0.4128	51	CV38-11	204	2	1.9486	0.4868
23	CV37-2	204	2	1.6056	0.3772	52	CV38-12	204	2	1.7513	0.4290
24	CV37-3	204	2	1.6543	0.3955	53	CV38-13	204	2	1.9934	0.4983
25	CV37-4	204	2	1.5653	0.3611	54	CV38-14	204	2	1.9999	0.5000
26	CV37-5	204	2	1.7906	0.4415	55	CV38-15	204	2	1.7828	0.4391
27	CV37-6	204	2	1.9068	0.4756						
28	CV37-7	204	2	1.9286	0.4815		Media	204	1.8727	1.6722	0.3743
29	CV37-8	204	2	1.6380	0.3895		Desviación estandar		0.3363	0.3090	0.1556

na = Numero observado de alelos

ne = Numero efectivo de alelos [Kimura y Crow (1964)]

h = Indice de Diversidad genética [Nei (1973)]

El numero de loci Polimorficos es : 48

El Porcentaje de loci polimorficos es: 87.27%

El número de alelos observados, número de alelos efectivos y el índice de diversidad genética para cada uno de los locus se refleja en el Cuadro 4. Puesto que el número total de loci polimórficos obtenidos con estos tres marcadores es de 48 (en promedio 16 por marcador), en este estudio el porcentaje de loci polimórficos es de 87.27 por ciento (loci polimórficos/total de loci). Este número de loci

polimórficos se considera suficiente para caracterizar la diversidad genética de la población. Resultados similares reportan Maccheroni *et al.* (2007), que con 53 loci provenientes de los mismos marcadores fueron capaces de discriminar 1,205 variedades de distintas procedencias con al menos 2 diferencias (alelos discriminativos). También You *et al.* (2013) utilizando 5 marcadores SSR diferentes, para caracterizar 105 variedades usadas como progenitores, obtuvieron 88 loci polimórficos (promedio de 18 por marcador). En otros estudios se reporta el uso de mayor número de marcadores, aunque menos informativos, como el de Que *et al.* (2014) quienes obtuvieron 163 fragmentos polimórficos en 20 marcadores SCoT (Start Codon Targeted Polymorphism), con un promedio de 8 fragmentos por marcador, o Perera *et al.* (2012) con 101 fragmentos de 15 marcadores SSR, lo que da un promedio de 7 fragmentos por marcador.

Cuadro 4. Resumen de la variación genética para todos los loci, utilizando los iniciadores CV29, CV37 y CV38 en una población de 204 variedades de caña de azúcar

Alelo	Locus	CV29-1	CV29-2	CV29-3	CV29-4	CV29-5	CV29-6	CV29-7	CV29-8
Alelo	0			0.5333	0.3833	0.3442	0.5198	0.6041	0.6745
Alelo	1	1	1	0.4667	0.6167	0.6558	0.4802	0.3959	0.3255
Alelo	Locus	CV29-9	CV29-10	CV29-11	CV29-12	CV29-13	CV29-14	CV29-15	CV29-16
Alelo	0	0.7154	0.7939	0.631	0.7999	0.7909	0.685	0.6119	0.6987
Alelo	1	0.2846	0.2061	0.369	0.2001	0.2091	0.315	0.3881	0.3013
Alelo	Locus	CV29-17	CV29-18	CV29-19	CV29-20	CV29-21	CV37-1	CV37-2	CV37-3
Alelo	0	0.7819	0.7879	0.576	0	0.6119	0.7088	0.7478	0.7286
Alelo	1	0.2181	0.2121	0.424	1	0.3881	0.2912	0.2522	0.2714
Alelo	Locus	CV37-4	CV37-5	CV37-6	CV37-7	CV37-8	CV37-9	CV37-10	CV37-11
Alelo	0	0.7635	0.671	0.3894	0.5962	0.735	0.7758	0.7819	0.8318
Alelo	1	0.2365	0.329	0.6106	0.4038	0.265	0.2242	0.2181	0.1682
Alelo	Locus	CV37-12	CV37-13	CV37-14	CV37-15	CV37-16	CV37-17	CV37-18	CV37-19
Alelo	0	0.6458	0.5922	0.8058	0.3155	0.5677	0.5962	0.6567	0
Alelo	1	0.3542	0.4078	0.1942	0.6845	0.4323	0.4038	0.3433	1
Alelo	Locus	CV38-1	CV38-2	CV38-3	CV38-4	CV38-5	CV38-6	CV38-7	CV38-8
Alelo	0	0	0	0	0.6234	0.6157	0.6119	0.5719	0.6196
Alelo	1	1	1	1	0.3766	0.3843	0.3881	0.4281	0.3804
Alelo	Locus	CV38-9	CV38-10	CV38-11	CV38-12	CV38-13	CV38-14	CV38-15	
Alelo	0	0.6531	0.7879	0.4188	0.6884	0.5288	0.4964	0.6745	
Alelo	1	0.3469	0.2121	0.5812	0.3116	0.4712	0.5036	0.3255	

Los valores de PIC (Contenido de Información Polimórfica) o Índice de Diversidad Genética (Cuadro 4), abarcaron un rango de 0.28-0.50 (promedio 0.37). El marcador CV37 fue el más informativo de los tres con un PIC promedio de 0.39, para CV29 y CV38 se obtuvieron promedios de 0.36 y 0.37, respectivamente. Estos marcadores fueron más informativos que los utilizados

por Perera *et al.* (2012) quienes utilizaron 15 marcadores SSR diferentes a los nuestros en una población de 36 variedades, cuyo rango de PIC varió entre 0.18-0.32. Este rango indica que también existe mayor diversidad genética en nuestra población que en la evaluada por You *et al.* (2013) en la que se obtuvo un índice de diversidad genética promedio de 0.22 en 115 variedades y la evaluada por Que *et al.* (2014) con 0.26 en 107 variedades.

A pesar de que los marcadores SSR se clasifican como codominantes, debido a la naturaleza poliploide de la caña de azúcar cada marcador fue calificado como dominante y transformados a una matriz de 0 (ausencia) o 1 (presencia) para el cálculo de los coeficientes de similitud.

La representación de la variabilidad obtenida utilizando un análisis de coordenadas principales (Figura 2) muestra una dispersión de las 204 variedades analizadas, sin diferenciaciones claras, aunque en su distribución, es posible observar que la mayoría de variedades agrupa en la mitad derecha del plano, mientras que en la mitad izquierda las variedades son menos y están más dispersas.

En el trabajo realizado por Que *et al.* (2014), se analizó la diversidad genética de 107 variedades tomando 0.674 como

valor arbitrario del coeficiente de similitud, con el cual definieron 6 grupos. En este trabajo, al tomar como referencia arbitraria 0.60 como coeficiente máximo de similitud, es posible distinguir 20 grupos de variedades, los cuales se muestran en los siguientes dendrogramas (Figuras 3-7), elaborados con base en la matriz de similitud generada mediante los cálculos del coeficiente de Dice.

En la Figura 3 puede observarse que en el grupo I aparece solamente la variedad Akoki, con un coeficiente de similitud de 0.52 respecto a los demás grupos, lo cual tiene sentido considerando que es el único de los materiales que no es un híbrido mejorado, sino un clon hawaiano de *Saccharum officinarum* (Schenk *et al.*, 2004). Los grupos II y III muestran entre ellos una similitud de 0.58 y de 0.56 con los demás materiales. En el grupo II encontramos la variedad guatemalteca CG99-099 y la argentina NA56-75. El grupo III quedó formado por las variedades CP01-2471 y CP02-1049 y una variedad de Puerto Rico (PR77-3031), siendo las dos últimas las que presentan mayor similitud.

Figura 2. Representación gráfica de la dispersión de las 204 variedades obtenida mediante análisis de coordenadas principales

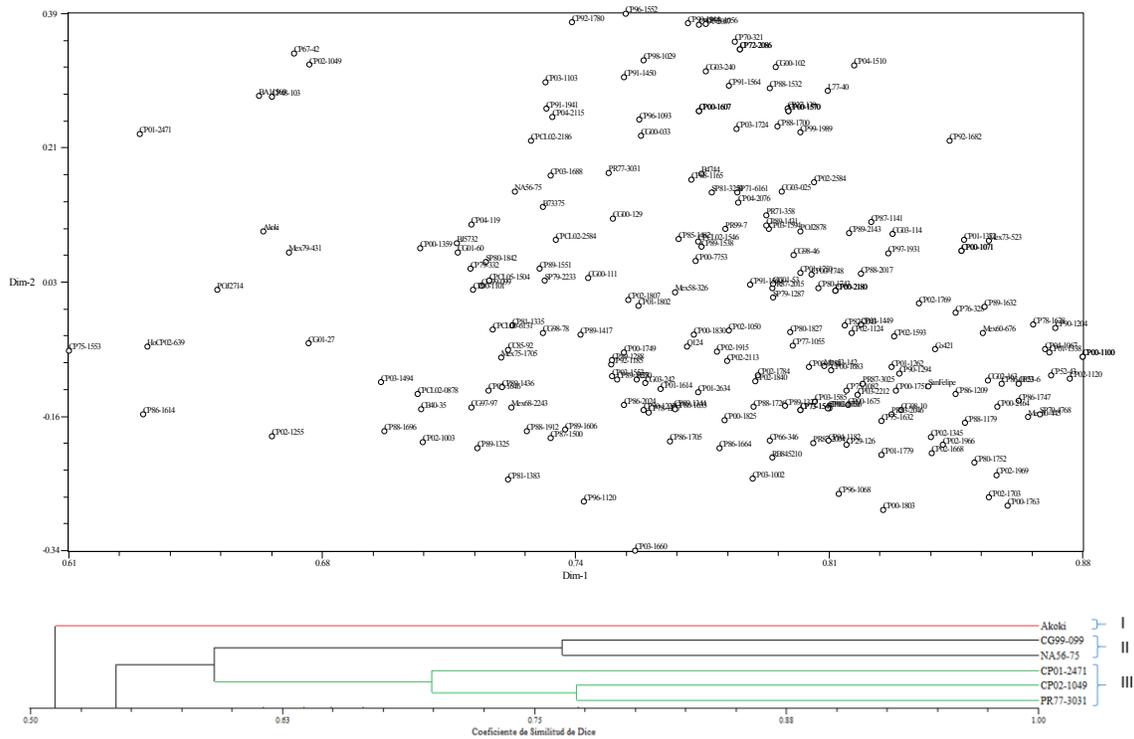


Figura 3. Variedades que conforman los grupos I a III y sus coeficientes de similitud

En la Figura 4 se muestra que en el grupo IV, junto con las variedades CP también agruparon las variedades L77-40 (Luisiana, Estados Unidos), B4744 de Barbados, SP71-6161 de Sao Paulo, Brasil, PR71-358 de Puerto Rico y algunas variedades guatemaltecas,

CG00-111, CG03-240, CG03-025. En este mismo grupo encontramos dos variedades incluidas en duplicado CP72-2086 y CP00-1607 con quienes tienen una similitud de 100 %, como se esperaba. En el grupo V agruparon ocho variedades CP, entre ellas CP91-2087 y CP92-1780 que mostraron el mayor coeficiente de similitud entre todas (0.90), dos variedades de Barbados BJ5732 y B73375, además de PR99-7 y cuatro variedades guatemaltecas, tres de la serie CG03 y una CG98. En el grupo VI, tres variedades de origen diverso, México, Colombia y Puerto Rico.

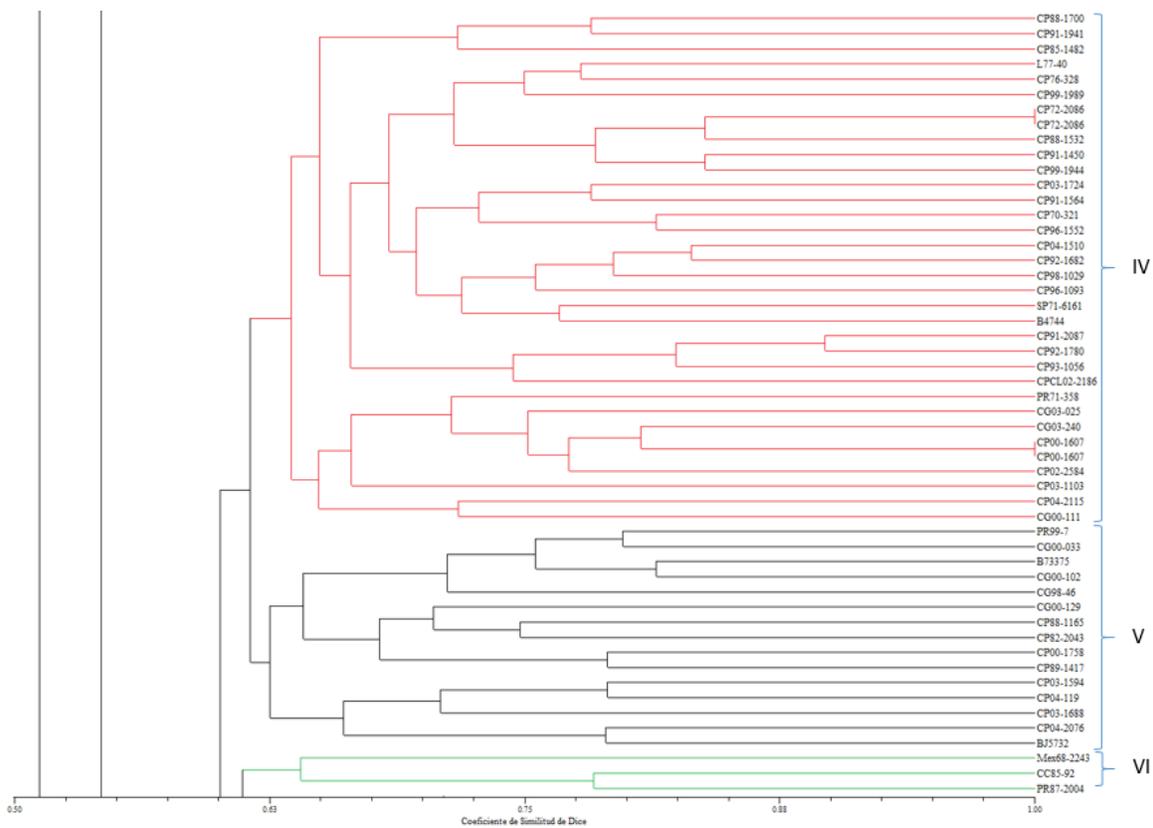


Figura 4. Variedades que conforman los grupos IV a VI y sus coeficientes de similitud

El grupo VII es el más numeroso (Figuras 5 y 6), agrupa 114 variedades, de ellas 93 CP, cinco variedades de México (Mex), cuatro de Guatemala, tres de Puerto Rico (PR), cuatro de Brasil, siendo tres de ellas Sao Paulo (SP79-1287, SP70-4768 y SP81-3250)

y una República de Brasil (RB84-5210). También agrupan aquí las variedades San Felipe, de origen desconocido, R570 de Reunión, Q124 de Australia, Co421 de India y POJ2878 de Indonesia, que es una de las primeras variedades resultantes de la nubilización de híbridos interespecíficos y una de las más utilizadas en los programas de mejora genética en todo el mundo (Moore *et al.*, 2014). En este grupo encontramos también cinco variedades duplicadas CP00-1071, CP00-1100 y CP00-2180, CP00-1570 y CP73-1547.

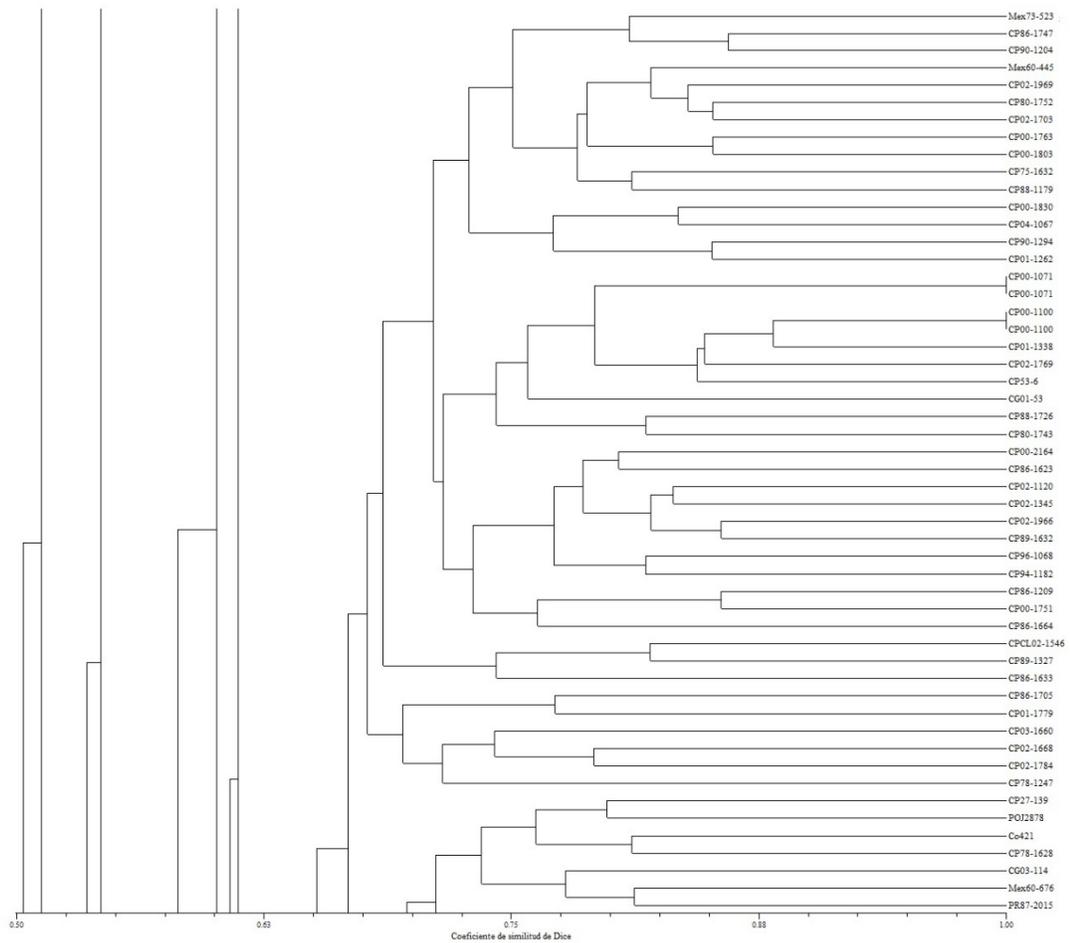


Figura 5. Variedades que conforman el grupo VII y sus coeficientes de similitud

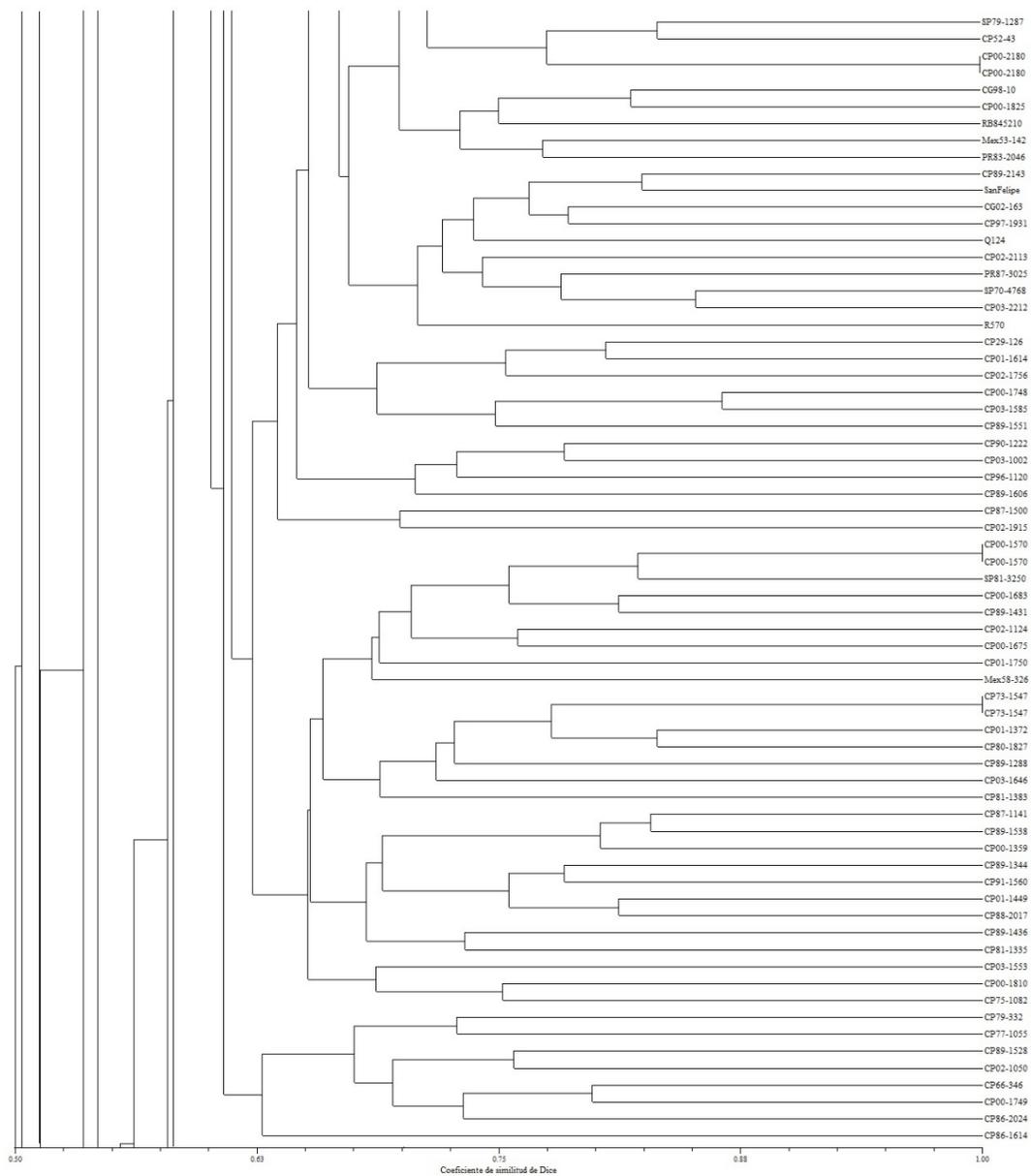


Figura 6. Continuación de las variedades que forman el grupo VII

La Figura 7 muestra los grupos VIII a XX, formados cada uno por un reducido número de variedades, siendo el X el mayor, con 12 variedades, cuatro de ellas guatemaltecas y

las demás de origen CP. Los grupos XIV, XVI, XVII, XIX y XX formados cada uno por una sola variedad de orígenes diversos, CB40-35 (Brasil), BA11569 (Barbados), Mex79-431 (México), CP75-1553 (Estados Unidos) y POJ2714 (Indonesia), siendo esta última la que presenta la menor similitud con relación a todas las demás variedades analizadas (0.50).

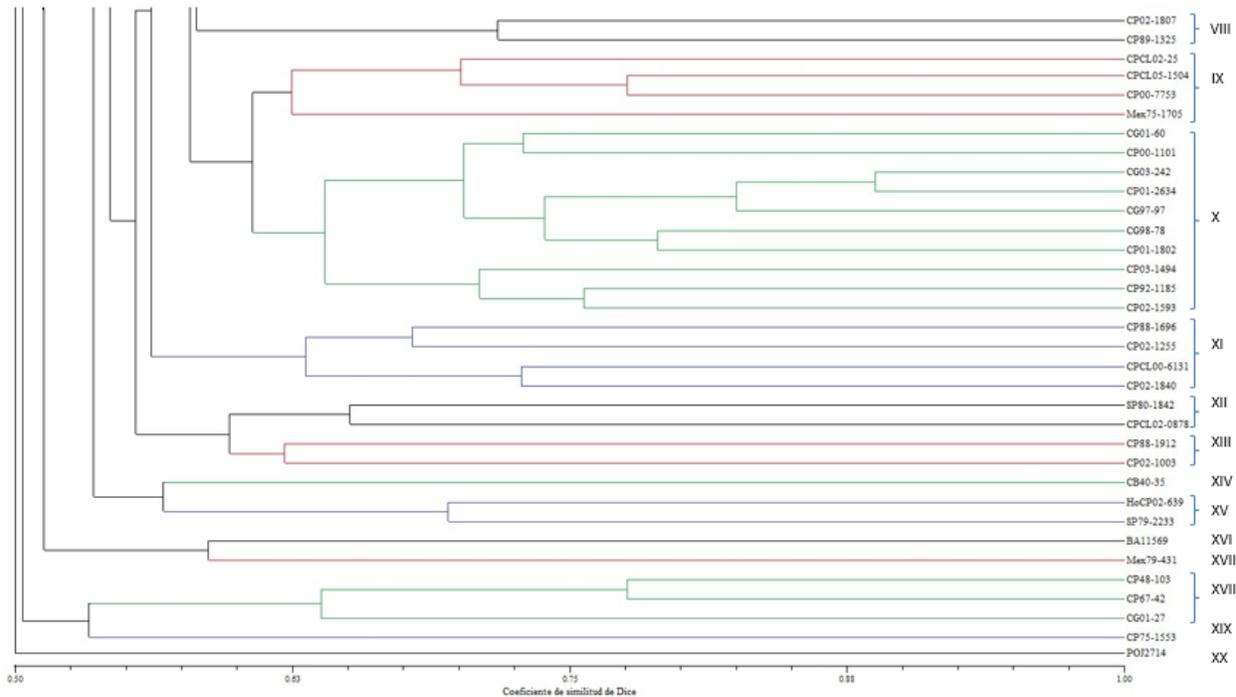


Figura 7. Variedades que conforman los grupos XI a XXII y sus coeficientes de similitud

Las 204 variedades analizadas no agruparon separadamente de acuerdo con los programas de mejoramiento y selección de donde proceden, lo que probablemente se deba al intercambio de variedades que realizan y a su uso como progenitores. Las 147 variedades procedentes de Canal Point (CP), Estados Unidos se distribuyeron en 12 de 20 grupos, lo que indica que a pesar de provenir del mismo programa de cruas, tienen alta diversidad. Las variedades de procedencia distinta a Canal Point, Estados Unidos, también quedaron distribuidas en los diferentes grupos (15 de 20). El análisis de coeficientes de similitud muestra que en esta población de 204 variedades, si se excluyen los coeficientes de similitud igual a 1 entre las 7 variedades con duplicados, los

demás coeficientes varían entre 0.50-0.90 (0.50 para la variedad POJ2714 con las demás variedades y 0.90 entre las variedades CP91-2087 y CP92-1780). Nuestros resultados difieren de los reportados por Perera *et al.* (2012) lo cual es esperable puesto que analizaron 36 variedades, ninguna en común con nuestro estudio. Estos autores utilizaron 15 marcadores SSR también diferentes a los nuestros, encontrando que todas formaron un solo grupo con coeficientes de similitud entre 0.73 y 0.96. También difieren con los resultados obtenidos por Pan *et al.* (2007), quienes utilizando 21 marcadores SSR diferentes a los nuestros en 116 variedades de los programas de mejoramiento de Luisiana, Estados Unidos (ninguna incluida en nuestro estudio), encontraron que, con excepción de tres variedades, las restantes 113 agruparon con coeficientes de similitud iguales o superiores a 0.7.

Por otro lado, You *et al.* (2013), analizaron la diversidad genética en 115 variedades progenitoras originadas en programas de mejoramiento de China, utilizando cinco marcadores SSR diferentes a los nuestros, identificando tres grupos formados por 91 (79 %), siete (6 %) y 17 (15 %) variedades. En nuestro caso, el grupo VII abarcó la mayor cantidad de materiales, con 114 de 204 (56 %).

En Guatemala, tres variedades CP ocupan el 63 por ciento del área sembrada con caña de azúcar, CP72-2086, CP73-1547 y CP88-1165. De acuerdo con nuestro análisis, estas variedades tienen

coeficientes de similitud menores a 0.60 y se ubicaron en los grupos IV, V y VII, lo que muestra su valor para uso en un programa de cruzas. Algunas de las variedades provenientes de Canal Point como las mencionadas, han mostrado buena adaptación y rendimientos superiores. Las primeras variedades con buena adopción resultantes del mejoramiento en Guatemala, también han tenido como progenitores a variedades CP en su mayoría, lo cual explica en parte, la preferencia local por utilizar progenitores de esta procedencia.

De acuerdo con Moore *et al.* (2014), es de esperar que la diversidad genética sea baja en las actuales poblaciones de mejoramiento, si se considera que las variedades modernas se derivan esencialmente de entre 15-20 variedades nobilizadas, las que a su vez nos conducen a la base genética inicial nobilizada en Java e India. Aunque se han utilizado en el marco de este trabajo tres marcadores (CV29, CV37 y CV38) que han resultado útiles para un primer análisis de diversidad genética en híbridos de caña de azúcar, la población estudiada se está analizando actualmente con otros siete marcadores moleculares lo cual permitirá definir mejor las diferencias entre grupos.

La información obtenida sirve para planificar cruzas entre progenitores distantes que tengan mayor probabilidad de progenies con buena expresión de heterosis, evitando al mismo tiempo reducir la ya estrecha

base genética de la caña de azúcar cultivada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken K., McNeil M. (2010) Diversity analysis. In: Genetics, genomics and breeding of sugarcane. Henry, R. y Kole C. (eds.). CRC Press, New York. 264p.
2. Harvey M., Botha F.C. (1996). Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. *Euphytica* 89:257-265.
3. Hoisington D, Khairallah M, González-de-Léon D: Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory México: CYMMYT; 1994.
4. Kimura M., Crow J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* (49): 725-738.
5. Lackshmanan P., Geijskes R., Aitken K., Grof C., Bonnett G., Smith G. (2005). Sugarcane Biotechnology: The challenges and opportunities. *In vitro Cellular Development and Biology of Plants*. 41: 345-363
6. Maccheroni, W., Jordao, H., Degaspari, R., Matsuoka, S. (2007). Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. (26):889-900.
7. Moore P.H., Paterson A.H., Tew T. (2014). Sugarcane: The crop, the plant and domestication. En: *Sugarcane: Physiology, Biochemistry and Functional Biology*. P. Moore and F. Botha (Eds.). Wiley Blackwell 716p.
8. Nei M. (1973). Genetic diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Part I, 70(12): 3321-3323.
9. Orozco H., Quemé J.L., Ovalle W., Castellanos S., Longo F. (2012). Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar en Guatemala. En: *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Melgar M., Meneses A., Orozco H., Pérez O., Espinoza R. (eds.). CENGICANA, Guatemala 512 p.
10. Parida S.K., Kalia S.K., Kaul S., Dalal V., Hemaprabha G., Selvi A., Pandit A., Singh A., Gaikwad K., Sharma T.R., Srivastava P.S., Singh N., Mohapatra T. (2008). Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics* doi: 1007/s00122-008-0902-4.
11. Perera M., Arias M., Costilla D., Luque C., García M., Díaz Romero C., Racedo J., Ostengo S., Filippone M, Cuenya M, Castagnaro, A. (2012). Genetic diversity assessment and genotype identification in sugarcane based on DNA markers and morphological traits. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-012-0661-9.
12. Que Y.X., Pan Y.B., Lu Y., Yang C., Yang Y., Huang N., Xu L. (2014). Genetic Analysis of Diversity within a Chinese Local Sugarcane Germplasm Based on Start Codon Targeted

- Polymorphism. BioMed Research International. Article ID 468375, 10 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/468375>
13. Quemé J., Molina L., Melgar M. (2005). Analysis of genetic similarity among 48 sugarcane varieties using microsatellite DNA sequences. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. (25): 592-596.
 14. Rohlf, F.J. (2003). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYSpc). Exeter Software, New York.
 15. Roughan, P., Waldron, J., & Glasziou, K. (1971). Starch inheritance in *Saccharum*. Enzyme polymorphism for B-amylase in interspecific and intergeneric hybrids. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, 14:257-265.
 16. Schenk S., Crepeau M.W., Wu K.K., Moore P.H., Yu Q., Ming R. (2004). Genetic Diversity and Relationships in Native Hawaiian *Saccharum officinarum* Sugarcane. *Journal of Heredity* 95 (4): 327-331.
 17. Singh, R., Mishra, S., Singh, S., Mishra, N., & Sharma, M. (2010). Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. *Australian Journal of Crop Science*, 116-125.
 18. You Q., Xu L., Zheng Y., Que Y.X. (2013). Genetic Diversity Analysis of Sugarcane Parents in Chinese Breeding Programmes Using gSSR Markers. *The ScientificWorld Journal*, Article ID 613062, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/613062>.