

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR
CON MARCADORES DE SECUENCIA SIMPLE REPETIDA
TESIS DE GRADO

CARLOS GABRIEL MADDALENO CASTELLANOS
CARNET 20999-10

ESCUINTLA, MARZO DE 2016
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIETADES DE CAÑA DE AZÚCAR
CON MARCADORES DE SECUENCIA SIMPLE REPETIDA
TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

POR
CARLOS GABRIEL MADDALENO CASTELLANOS

PREVIO A CONFERÍRSELE
EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES EN EL GRADO
ACADÉMICO DE LICENCIADO

ESCUINTLA, MARZO DE 2016
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: P. EDUARDO VALDES BARRIA, S. J.
VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO
VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS
SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

DECANO: DR. ADOLFO OTTONIEL MONTERROSO RIVAS
VICEDECANA: LIC. ANNA CRISTINA BAILEY HERNÁNDEZ
SECRETARIA: ING. REGINA CASTAÑEDA FUENTES
DIRECTOR DE CARRERA: MGTR. LUIS MOISÉS PEÑATE MUNGUÍA

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

ING. LUIS GERARDO MOLINA MONTERROSO

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. ADÁN OBISPO RODAS CIFUENTES
MGTR. HÉCTOR ALFREDO SAGASTUME MENA
ING. EDWIN LEONEL ARGUETA VENTURA

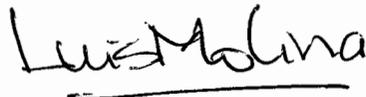
Guatemala, 30 de enero de 2016

Honorable Consejo:
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Universidad Rafael Landívar

Honorable Consejo:

Respetuosamente me dirijo a ustedes, para manifestar que el señor Carlos Gabriel Maddaleno Castellanos con carné 20999-10 finalizo el trabajo de tesis titulado "**Caracterización Molecular de variedades de Caña de azúcar con marcadores de secuencia simple repetida.**" El cual se considera como aporte significativo a la investigación en la industria agrícola azucarera nacional, por lo que el señor Carlos Gabriel Maddaleno Castellanos, puede realizar sus trámites necesarios para obtener el título de ingeniero agrónomo en el grado de licenciado en ciencias agrícolas y ambientales.

Atentamente,



Ing. Agr. Luis Gerardo Molina Monterroso
Asesor
Código URL 10869



Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante CARLOS GABRIEL MADDALENO CASTELLANOS, Carnet 20999-10 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES, de la Sede de Escuintla, que consta en el Acta No. 0616-2016 de fecha 20 de febrero de 2016, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR
CON MARCADORES DE SECUENCIA SIMPLE REPETIDA**

Previo a conferírsele el título de INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES en el grado académico de LICENCIADO.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 3 días del mes de marzo del año 2016.



ING. REGINA CASTAÑEDA FUENTES, SECRETARIA
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
Universidad Rafael Landívar



AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Luis Molina por su amistad y por su valiosa asesoría en la revisión y corrección de este documento.

A CENGICAÑA por permitirme realizar mi trabajo de investigación y formar parte de un excelente equipo de trabajo.

A mis catedráticos por compartir su conocimiento.

A mis Compañeros por su amistad y apoyo.

DEDICATORIA

A

Mis Padres: por darme el don de la vida y por ser mi guía en todo momento

Mis hermanos: por su amistad, cariño y buenos momentos que hemos pasado.

Mis abuelitos: por sus enseñanzas y su ternura.

Mi esposa: por su inspiración y amor en las buenas y en las malas.

Mis hijas: como ejemplo de que todo lo que se sueña se alcanza.

ÍNDICE

Página

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	2
2.1	IMPORTANCIA DE LA CAÑA DE AZÚCAR	2
2.2	HISTORIA DEL FITOMEJORAMIENTO DE LA CAÑA DE AZÚCAR.....	2
2.3	GENÉTICA DE LA CAÑA DE AZÚCAR.....	3
2.4	BIOTECNOLOGÍA.....	3
2.4.1	Marcadores Moleculares	4
2.5	TIPOS DE MARCADORES DE ADN	5
2.5.1	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	5
2.5.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	5
2.5.3	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).....	5
2.5.4	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	5
2.5.5	Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)	6
2.6	USOS DE LOS MICROSATÉLITES	6
2.7	MARCADORES MOLECULARES EN CAÑA DE AZÚCAR	7
2.8	MARCADORES MOLECULARES EN CAÑA DE AZÚCAR EN GUATEMALA.....	7
2.9	GLOSARIO.....	8
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3.1	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	10
3.2	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	10
IV.	OBJETIVOS	11
4.1	GENERAL.....	11
4.2	ESPECÍFICOS	11
V.	METODOLOGÍA	12
5.1	AMBIENTE (LUGAR DE TRABAJO).....	12
5.2	SUJETOS Y/O UNIDADES DE ANÁLISIS	12
5.3	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	13
5.4	INSTRUMENTO (TÉCNICA, CUESTIONARIO, REGISTROS)	13
5.5	PROCEDIMIENTO	13

	Página
5.5.1 Muestreo de material vegetal.....	13
5.5.2 Extracción de ADN	13
5.5.3 Espectrofotometría	14
5.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa	15
5.5.5 Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.....	16
5.6 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	16
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1 SIMILITUD GENÉTICA.....	18
6.2 CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA	25
6.3 PORCENTAJE DE BANDAS POLIMÓRFICAS.....	26
6.4 NÚMERO DE LOCI, NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS y NÚMERO EFECTIVO DE ALELOS.....	26
VII. CONCLUSIONES	28
VIII. RECOMENDACIONES.....	29
IX. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Listado de variedades de caña de azúcar caracterizadas.....	12
Cuadro 2. Secuencia para cada uno de los marcadores.....	15
Cuadro 3. Grupos 1 a 10 sus procedencias y coeficiente de similitud.....	20
Cuadro 4. Frecuencias alélicas y PICs CV29.....	25
Cuadro 5. Frecuencias alélicas y PICs CV37.....	25
Cuadro 6. Frecuencias alélicas y PICs CV38.....	26
Cuadro 7. Resultados de la evaluación de los marcadores.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Gel de poliacrilamida marcador CV37.....	18
Figura 2. Dendrograma basado en el coeficiente de Dice.....	19
Figura 3. Variedades de los grupos 1 y 2.....	20
Figura 4. Variedades del grupo 3 (primera parte).....	21
Figura 5. Variedades del grupo 3 (segunda parte).....	22
Figura 6. Dispersión de variedades de Estados Unidos y Guatemala.....	23
Figura 7. Variedades de los grupos 4 a 10.....	24

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR CON MARCADORES DE SECUENCIA SIMPLE REPETIDA

RESUMEN

Se desarrolló una caracterización molecular con marcadores de secuencia simple repetida, en 100 variedades de caña de azúcar, con el objetivo de generar información para el programa de Fitomejoramiento de CENGICAÑA. Los marcadores de secuencia simple repetida utilizados fueron el CV29, CV37 y CV38. La matriz binaria obtenida de los patrones electroforéticos se analizó y se obtuvieron las frecuencias alélicas. Los porcentajes de alelos polimórficos fueron 85.71%, 96.15% y 83.33% para CV29, CV37 y CV38, respectivamente. El número de alelos efectivos fue 1.66, 1.58 y 1.67, respectivamente. El contenido de información polimórfica (PIC) fue 0.366, 0.3485 y 0.3652, respectivamente. Además se obtuvo un dendrograma basado en el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), cuyo análisis permite observar la formación de 10 grupos con base en un coeficiente de similitud promedio del 60%. Estos resultados permitieron validar la utilización de dichos marcadores para la identificación de diferencias entre genotipos en caña de azúcar.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF 100 SUGARCANE CULTIVARS WITH MICROSATELITE MARKERS

SUMMARY

A characterization with single sequence repeat markers of 100 sugarcane cultivars in order to generate information for the crossing program of CENGICAÑA was developed. Markers used were the CV29, CV37 and CV38. The binary matrix obtained from the electrophoresis patterns was analyzed and allelic frequencies were obtained as well as the percentage of polymorphic alleles which was 85.71%, 96.15% and 83.33% for CV29, CV37 and CV38 respectively. The number of effective alleles 1.66, 1.58 y 1.67 for CV29, CV37 and CV38 respectively, polymorphic information content (PIC) 0.366, 0.3485 and 0.3652 for CV29, CV37 y CV38 respectively. Also a dendrogram based on the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), clustering method was obtained, the analysis shows the formation of 10 groups based on an average 60% similarity, this results allow the validation of use of such markers to identify differences between the sugarcane genotypes.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), como brazo tecnológico de la agroindustria azucarera de Guatemala, es incrementar la productividad del cultivo de la caña de azúcar. Una de las estrategias que se emplean con tal propósito es el uso de variedades mejoradas.

En el desarrollo de variedades mejoradas, el área de fitomejoramiento requiere información que facilite los procesos de selección de variedades con características agronómicas deseables y que a su vez posibilite cruces entre variedades genéticamente distantes.

La biotecnología brinda las herramientas necesarias para la generación de la información para el análisis de diversidad genética. Los marcadores moleculares permiten analizar la genética de las variedades de caña de azúcar mediante una serie de bandas, pudiendo entonces determinar el grado de relación genética entre ellas.

En esta investigación se caracterizaron 100 variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), provenientes de la colección nacional de CENGICAÑA y se analizaron los niveles de similitud genética utilizando tres marcadores de secuencia simple repetida. A partir de los patrones de bandas visualizados en los geles se codificó la información alélica en una matriz binaria de ausencia y presencia, la cual se utilizó para determinar el contenido de información polimórfica (PIC), el porcentaje de bandas polimórficas, el número de alelos observados y el número de alelos efectivos en cada marcador. Además, se hizo un análisis de similitud, basado en el coeficiente de Dice, con cuyos datos se realizó un análisis de conglomerados y se construyó un dendrograma basado en el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 IMPORTANCIA DE LA CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar es actualmente cultivada por más de 100 países con más de 20 millones de hectáreas en el mundo, en donde se producen 1,300 millones de toneladas de caña (D'Hont, Mendes, Menossi, Vincentz, Van Sluys, Glaszmann y Ulian, 2008). Es además, el cultivo industrial más cercano a la sostenibilidad como fuente renovable de energía (Wu y Birch, 2007).

La agroindustria azucarera guatemalteca ha crecido permanentemente desde 1960. El aumento en la productividad ha sido más notable en los últimos 20 años. El azúcar es el segundo producto agrícola en Guatemala en generación de divisas. Para la zafra 2009/2010 el azúcar representó el 10.25% del PIB de las exportaciones totales del país. Actualmente se siembran 230,000 hectáreas de caña de azúcar a nivel nacional, generando un aproximado de 65,000 empleos directos y 350,000 empleos indirectos. Guatemala es el quinto país exportador de azúcar a nivel mundial y tercer lugar en rendimientos de azúcar por hectárea, por lo tanto uno de los objetivos primordiales es mantener la competitividad (Melgar, 2012).

2.2 HISTORIA DEL FITOMEJORAMIENTO DE LA CAÑA DE AZÚCAR

De acuerdo con Lakshmanan, Geijskes, Aitken, Grof, Bonnett y Smith (2005), hasta fines del siglo XIX, la mayoría de caña cultivada eran clones de *Saccharum officinarum* con altos niveles de sacarosa. Uno de los principales logros en la mejora genética lo constituyeron los híbridos entre *Saccharum officinarum* y la especie silvestre *Saccharum spontaneum*. La hibridación interespecífica en el género *Saccharum* fue iniciada por mejoradores holandeses en la isla de Java alrededor de 1885. Producto de este trabajo, se obtuvieron varios híbridos interespecíficos, incluyendo los cultivares POJ 2725 y POJ 2878, éste último, en especial, ha sido utilizado como progenitor de muchos de los cultivares actuales. Los cultivares modernos han sido desarrollados a partir de estos

híbridos interespecíficos y tienen entre $2n = 100$ y $2n = 130$ cromosomas, de los cuales 10 – 25 % pertenecen a *S. spontaneum* (D'Hont, Grivet, Feldman, Rao, Berding y Glaszmann, 1996). Da Silva, Sorrells, Burnquist y Tanksley (1993) mencionan que la caña de azúcar moderna es un cultivo muy complejo genéticamente, por lo que su mejoramiento genético en el ámbito tradicional es problemático.

2.3 GENÉTICA DE LA CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum*, de la familia Poaceae. D'Hont, Ison, Aliz, Roux y Glaszmann (1998), explican que dentro de este género hay incluidas seis especies: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule*. Según Sreenivasan, Ahloowalia y Heinz (1987) los clones con un número mayor de cromosomas son considerados atípicos, para *S. officinarum* los citotipos principales son $2n= 60$ y 80 con un número básico probable de juegos de $x=10$ (D'Hont, *et al* 1998). Por otro lado *S. spontaneum* exhibe un amplio rango en el número de cromosomas $2n=36$ a $2n=128$ con cinco citotipos principales $2n=64, 80, 96, 112$ y 128 . D'Hont *et al.* (1998) determinaron que el número básico de juegos de cromosomas para *S. Spontaneum* es de $x=8$.

2.4 BIOTECNOLOGÍA

Biotecnología es toda aquella aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (ONU, 1992).

Se divide en dos grupos que son: la biotecnología convencional que abarca la fermentación alcohólica, la fermentación láctica, la fermentación acética y otros tipos de fermentaciones, y la biotecnología moderna que incluye el cultivo de tejidos, los marcadores moleculares y la ingeniería genética. Los marcadores moleculares han

demostrado tener distintas aplicaciones en el mejoramiento genético de variedades de cultivos (Molina y Melgar, 2012).

2.4.1 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que pueden ser identificados y que pueden estar relacionados con genes de interés debido al ligamiento. Supongamos la existencia de dos secuencias de ADN A y B una al lado de otra, la secuencia A puede ser localizada en una muestra de individuos, pero no contiene ninguna información de valor, mientras que la secuencia B contiene información de mucho interés pero no se sabe cómo identificarla únicamente se sabe que está relacionada a A. De esta manera si encontramos A sabremos que B está presente y es así como la secuencia A se convierte en marcador de la secuencia B (Molina y Melgar, 2012).

Dentro de los marcadores moleculares se menciona la existencia de dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN. Los marcadores de ADN se basan en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias de ADN entre individuos, estos pueden ser de carácter dominante o codominante. Dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas. Categoría 1: métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo, RFLP. Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores (“primer”) arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo RAPD. Categoría 3: PCR con sitio “objetivo específico”, por ejemplo SSR. Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la PCR (Karp y Edwards, 1998).

2.5 TIPOS DE MARCADORES DE ADN

2.5.1 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Valadez y Kahl (2000) definen los RFLP como la variación en la longitud de los fragmentos de ADN producida por una endonucleasa de restricción específica a partir de ADN genómico de dos o más individuos de una especie.

2.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables (Valadez y Kahl, 2000). Al final de la reacción de PCR, la secuencia específica se acumula en billones de copias conocidas como amplicones.

2.5.3 Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

Este análisis fue descrito por primera vez en 1990 por tres grupos de investigadores independientes Williams, Kubelik, Livak, Rafalski y Tingey (1990); Welsh y McClelland (1990); y Phillips, Rodríguez y Fritz (1995). Mencionan que es la misma metodología PCR, por lo que a veces se le refiere con este nombre. La modificación que les dio origen consistió en sustituir el uso de un par de iniciadores cuidadosamente diseñados y un poco largos, por un solo iniciador corto, de alrededor de 10 nucleótidos de longitud y de secuencia arbitraria, con la capacidad de unirse a regiones específicas en el genoma (Waugh y Powell, 1992).

2.5.4 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

El análisis AFLP combina la digestión con enzimas de restricción con la PCR. El primer paso involucra la digestión del ADN con dos enzimas específicas de restricción, una de las cuales corta secuencias precisas y la otra corta más frecuentemente. Es necesario

agregar adaptadores para que éstos se peguen en los bordes de los fragmentos recién formados y de esta manera proveer una secuencia conocida para poder amplificar mediante PCR (Karp, Kresovich, Bhat, Ayad y Hodgkin, 1997).

2.5.5 Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR por sus siglas en inglés) son regiones de secuencias pequeñas (2 a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas por todo el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma (Phillips, *et al*, 1995).

Dado que la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2000).

2.6 USOS DE LOS MICROSATÉLITES

Los microsatélites son marcadores moleculares de ADN comúnmente usados en el mejoramiento genético de plantas para el mapeo de genes y el subsecuente desarrollo de un procedimiento de selección asistida por marcadores (Varshney, Graner, y Sorrells, 2005). Los microsatélites se han utilizado exitosamente para la identificación, clasificación y administración de colecciones de germoplasma, selección de padres, distinción de variedades, introgresión de rasgos deseables y determinación de paternidad (Lee, 1995).

2.7 MARCADORES MOLECULARES EN CAÑA DE AZÚCAR

Roughan, Waldron y Glasziou (1971) reportan por primera vez el uso de marcadores moleculares en caña de azúcar en donde analizando la variación de la isoenzima β -amilasa en *Sacharum officinarum*, *Saccharum 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, aunque no encontraron ninguna correlación entre los marcadores y el contenido de almidón en el tallo de la planta. En la actualidad los marcadores más utilizados son los marcadores de ADN, dichos marcadores pueden obtenerse por restricción de fragmentos o por PCR (Molina y Melgar, 2012).

El primer mapa genético de *Saccharum* fue publicado por Al-janabi, Honeycutt, McClelland y Sobral (1993). Los marcadores fueron generados utilizando polimorfismos de ADN amplificado aleatoriamente (RAPD por sus siglas en inglés) provenientes del cruzamiento de un clon de *Saccharum spontaneum* y una planta doble haploide proveniente de la misma variedad (Al-janabi, *et al*, 1993).

Da silva *et al.*(1993), utilizaron marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés). Hoarau, Offman, D'Hont, Risterucci, Roques y Glaszmann (2001) utilizaron marcadores polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) y Aitken, Jackson, McIntyre, (2005) con AFLP y marcadores de secuencia simple repetida (SSR o microsatélites) para el mapeo de genes en caña de azúcar.

2.8 MARCADORES MOLECULARES EN CAÑA DE AZÚCAR EN GUATEMALA

Para el caso particular de CENGICAÑA, Quemé, Molina y Melgar(2005), reportan un análisis de similitud genética en 48 variedades de caña de azúcar mediante la generación de patrones de bandas con cinco marcadores microsatélite (SSR) que fueron proporcionados por el CIRAD (*Le Recherche Agronomique Pour Le Developpement*) de

Francia. A su vez, Maldonado, Quemé y Ovalle (2006) reportan la utilización de marcadores AFLP en el análisis de las relaciones genéticas en variedades evaluadas para resistencia a Roya marrón. Molina, Ávalos, Quemé y Maddaleno (2014) reportan el desarrollo de dos caracterizaciones moleculares utilizando marcadores moleculares de secuencia simple repetida.

Para la caracterización de variedades de caña de azúcar con el objetivo de generar información de apoyo para la selección de padres en el proceso de cruzamientos, en CENGICAÑA se utilizan los marcadores microsatélite CV29, CV37 y CV38 reportados por Maccheroni, Jordao, Degaspari, Matsuoka (2007). Dichos marcadores provienen de una gran base de datos generada de la secuenciación del genoma expresado de la caña de azúcar en donde aproximadamente 37,000 microsatélites fueron identificados en 33,000 secuencias. Ciento doce loci fueron seleccionados y validados en un grupo de accesiones de caña de azúcar que comparten diversos niveles de relación genética. Estos loci fueron clasificados de acuerdo a su contenido de información polimórfica (PIC por sus siglas en inglés) y por la calidad visual de sus perfiles moleculares. Tres de estos loci, CV29, CV37 y CV38 se seleccionaron debido a su capacidad de discriminar gran número de variedades (Maccheroni *et al*, 2007).

2.9 GLOSARIO

A continuación se describen varios términos utilizados en este documento, según Kahl (2001):

Alelo: una de las formas diferentes de un gen dado que ocupa el mismo locus en un cromosoma en particular.

Amplicón: cualquier secuencia de ADN que se amplifica por medio de ciclos de replicación.

Citotipo: individuo de una especie que tiene un factor cromosómico diferente al resto.

Cromosoma: una de las estructuras de forma roscada o de varilla que se encuentra dentro de los núcleos de las células eucariotas que consiste en la cromatina muy

condensada y contiene la información genética para las funciones específicas de la célula.

Gen: la unidad física y funcional fundamental de la herencia que lleva la información de una generación a la siguiente. Un gen es una secuencia específica de nucleótidos en el ADN que determinan la secuencia de nucleótidos de ARN de transferencia o de ARN ribosomal, o la secuencia de aminoácidos de un polipéptido específico.

Genómico: relativo a genoma.

Haploide: se aplica a la célula o al organismo cuya dotación genética consta de un solo juego de cromosomas en el núcleo celular.

Híbrido: se aplica al animal o vegetal que procede de la unión de dos individuos de genotipos diferentes.

Loci: plural de locus.

Locus: la posición de un gen o de un marcador en un cromosoma.

Polimorfismo: la existencia de muchas formas fenotípicas o características genéticas en una población. Un cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro de un genoma generado básicamente por la reorganización del ADN.

Primer: fragmento de ADN de una sola hebra requerido por la ADN polimerasa para la replicación de una secuencia específica. Se le conoce también como cebador, iniciador y oligonucleótido.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La caracterización de variedades de caña de azúcar surge de la necesidad de diferenciar los genotipos presentes en la colección nacional de CENGICAÑA, para ser entonces incluidos en el programa de cruzamientos y obtener nuevas variedades, favoreciendo a la agroindustria azucarera. Los cruzamientos entre individuos genéticamente similares pueden dar como resultado progenies con características desfavorables, mientras que el cruce entre dos individuos genéticamente distantes tiene mayor probabilidad de dar lugar a una progenie que expresa el vigor híbrido. Durante mucho tiempo los fitomejoradores de caña de azúcar han obtenido información proveniente de caracterizaciones morfológicas. Los resultados de una caracterización morfológica pueden variar en función del tiempo, ambiente, manejo y fitomejorador que realice la caracterización, mientras que los patrones genéticos serán los mismos y permitirán también identificar las variedades.

3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El programa de mejoramiento genético tiene como objetivo obtener variedades con altos rendimientos de azúcar por hectárea con adecuadas características agronómicas, buena adaptabilidad, resistencia a las principales enfermedades, entre otros (Melgar, 2012). Cualquier programa de mejoramiento genético en plantas tiene dos componentes principales que son: creación de variabilidad genética a través de cruzamientos y selección (Cox, Hogarth y Smith, 2000). Los microsatélites y otros marcadores de ADN han sido exitosamente utilizados en programas de mejoramiento en plantas para identificar, clasificar y administrar colecciones de germoplasma (Maccheroni *et al*, 2007). Dichas metodologías generan información que ayuda específicamente en la selección de variedades utilizadas en cruzamientos. Los marcadores microsatélite son capaces de revelar alto grado de polimorfismo (Parida, Kalia, Kaul, Dalal, Hemaprabha, Selvi, Pandit, Singh, Gaikwad, Sharma, Srivastava, Singh y Mohapatra, 2008), garantizando mejores resultados en la caracterización, facilitando la obtención de variabilidad genética en la progenie.

IV. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Caracterizar a nivel molecular, 100 variedades de caña de azúcar, utilizando marcadores de secuencia simple repetida, como apoyo a las acciones del programa de fitomejoramiento de CENGICAÑA.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar la similitud genética existente en un grupo de 100 variedades de caña de azúcar mediante el uso de tres marcadores de secuencia simple repetida.
- Determinar el contenido de información polimórfica (PIC) de cada marcador.
- Determinar el porcentaje de bandas polimórficas de cada marcador.
- Determinar el número de loci y alelos observados así como el número efectivo de alelos en cada marcador.

V. METODOLOGÍA

5.1 AMBIENTE (LUGAR DE TRABAJO)

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar ubicado a 14° 19' 47.3" latitud norte 91° 03' 20.0" longitud oeste, en el municipio de Santa Lucía Cotzumalguapa, departamento de Escuintla.

5.2 SUJETOS Y/O UNIDADES DE ANÁLISIS

Cien variedades de caña de azúcar provenientes de la colección nacional de CENGICAÑA se muestrearon con el objetivo de caracterizarlas (cuadro 1). Las variedades muestreadas se seleccionaron bajo el criterio de concentración de azúcar, adaptabilidad, características agronómicas, resistencia a enfermedades y plagas, entre otras.

Cuadro 1. Listado de variedades de caña de azúcar caracterizadas.

No.	Variedad	No.	Variedad	No.	Variedad	No.	Variedad
1	Akoki	26	CP00-1071	51	CP70-321	76	HoCP02-639
2	B4744	27	CP00-1100	52	CP72-2086	77	L77-40
3	B73375	28	CP00-1101	53	CP73-1547	78	Mex53-142
4	BA11569	29	CP00-1570	54	CP88-1165	79	Mex58-326
5	BJ5732	30	CP00-1607	55	CP88-1532	80	Mex60-445
6	CB40-35	31	CP00-7753	56	CP88-1700	81	Mex60-676
7	CC85-92	32	CP01-1802	57	CP89-2143	82	Mex68-2243
8	CG00-033	33	CP01-2471	58	CP91-1450	83	Mex73-523
9	CG00-102	34	CP01-2634	59	CP91-1564	84	Mex75-1705
10	CG00-111	35	CP02-1049	60	CP91-1941	85	Mex79-431
11	CG00-129	36	CP02-1124	61	CP91-2087	86	NA56-75
12	CG01-27	37	CP02-2113	62	CP92-1185	87	POJ2878
13	CG01-53	38	CP02-2584	63	CP92-1682	88	PR71-358
14	CG01-60	39	CP03-1103	64	CP92-1780	89	PR77-3031
15	CG02-163	40	CP03-1494	65	CP93-1056	90	PR83-2046
16	CG03-025	41	CP03-1594	66	CP96-1093	91	PR87-2004
17	CG03-114	42	CP03-1688	67	CP96-1552	92	PR87-2015
18	CG03-240	43	CP03-1724	68	CP97-1931	93	PR87-3025
19	CG03-242	44	CP04-119	69	CP98-1029	94	PR99-7
20	CG97-97	45	CP04-1510	70	CP99-1944	95	Q124
21	CG98-10	46	CP04-2076	71	CP99-1989	96	R570
22	CG98-46	47	CP04-2115	72	CPCL02-1546	97	San Felipe
23	CG98-78	48	CP27-139	73	CPCL02-2186	98	SP70-4768
24	CG99-099	49	CP48-103	74	CPCL02-2584	99	SP71-6161
25	Co421	50	CP67-42	75	CPCL05-1504	100	SP81-3250

5.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de carácter descriptivo, basada en la información genética de cada variedad, identificada con el uso de marcadores moleculares de secuencia simple repetida. Se obtuvo información que describe las relaciones genéticas de dichas variedades.

5.4 INSTRUMENTO (TÉCNICA, CUESTIONARIO, REGISTROS)

Las técnicas para la realización de la investigación incluyeron: muestreo de tejido vegetal, técnicas de extracción de ADN, espectrofotometría, técnica de PCR y electroforesis en geles de poliacrilamida.

5.5 PROCEDIMIENTO

5.5.1 Muestreo de material vegetal

El muestreo se realizó en la Colección Nacional de la Agroindustria Azucarera, localizada en la estación experimental de CENGICAÑA, que se encuentra a 300 msnm en la finca Camantulul. La colección cuenta con 2040 variedades de caña de azúcar, en su mayoría híbridos del género *Saccharum*. El muestreo se realizó con la técnica estándar utilizada por el área de Biotecnología. Esta técnica consiste en cortar la primera hoja con cuello visible de cada planta para después dividirla en tres partes y colocar únicamente el segmento medio dentro de una bolsa plástica con cierre hermético, previamente rotulada y almacenarla temporalmente en una hielera.

5.5.2 Extracción de ADN

Para el proceso de extracción de ADN se empleó el protocolo propuesto por Da Silva (2003), modificado para las condiciones del laboratorio de biotecnología. La extracción de ADN básicamente constó de una etapa de lisis, que consistió en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido, otra de

purificación, que implicó el retiro de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR y por último una o dos etapas de limpieza.

Se tomaron 150 mg de material vegetal y se maceraron con nitrógeno líquido dentro de un tubo de 1.5 mL, luego se agregó 600 uL de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) precalentado a 65 °C y se dejó en baño de María a 65 °C durante 30 minutos mezclando ocasionalmente, luego se sacó el tubo del baño maría y se dejó enfriar a temperatura ambiente, una vez alcanzada la temperatura ambiente se agregó 500 uL de una solución cloroformo:isopentanol (24:1) se mezcló y centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo en donde se agregó 15 uL de ARNasa (10 mg/mL) y se dejó incubar a 37 °C durante 30 minutos. Al terminar se repitió el lavado con cloroformo:isopentanol y se recuperó nuevamente el sobrenadante. Por último, se agregó 2.5 volúmenes de isopropanol frío y 1/10 de acetato de amonio para precipitar los ácidos nucleicos, se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos hasta formar una pastilla que posteriormente se lavó con alcohol etílico al 70 % y se dejó secar sobre la mesa, una vez seco se resuspendió en agua ultra pura y se almacenó a 4 °C.

5.5.3 Espectrofotometría

Se prepararon las muestras a analizar en tubos de 1.5 mL, agregando 995 uL de agua ultrapura y 5 uL de muestra, Una vez encendido el espectrofotómetro se seleccionó la actividad a realizar. Después de elegir la opción absorbancia, se marcó el cero con una muestra de la misma agua ultra pura utilizada para preparar las muestras a analizar a la longitud de onda deseada (260 nm - 280 nm para ADN, adicionalmente se obtuvo los valores de 320 nm para determinar los índices de pureza de las muestras). Luego se tomó la primera muestra (1mL) y se colocó dentro de la cubeta de cuarzo y se agregó 2 mL de agua ultra pura adicional para obtener un factor de dilución de 600 y se midió la absorbancia primero en 260 nm, luego en 280 nm y 320 nm. Posteriormente se limpió la cubeta de cuarzo con agua ultra pura de la misma que se utilizó para preparar las muestras y se repitió para la siguiente muestra, por último se anotaron los resultados.

Para el análisis se realizó la siguiente relación con la que se obtuvo un índice de pureza el cual es útil para determinar si se está realizando un buen trabajo durante la extracción del ADN. La relación ideal 260 nm / 280 nm es entre 1.7 y 1.8.

Para obtener la concentración se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{ADN} = (\text{abs } 260 - \text{abs } 320) * (50 \mu\text{g/mL}) * (\text{factor de dilución})$$

5.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa

El volumen total de la reacción fue de 10 uL. Para dicha reacción se utilizaron 8 uL del Master mix Amplitaq Gold 360 de Applied Biosystems y 2 uL de cada primer a 0.2 uM. Los iniciadores utilizados fueron CV29, CV37 y CV38 cuyas secuencias se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores utilizados en la caracterización de 100 variedades de caña de azúcar.

Nombre	Secuencia
CV29 f	5` - TCG CGT CCA CCA ATG TAA CC - 3`
CV29 r	5` - GCG TGC ATC GCT TGT GTC TT - 3`
CV37 f	5` - GGA TGG ACG ACG TGT CCT GG - 3`
CV37 r	5` - ATA AAG TGG CCG CTT GGA TTG A - 3`
CV38 f	5` - GAA GCA GGG GCC TCA AGT TG- 3`
CV38 r	5` - GTC AAA CAG GCG ATC TGG CTC - 3`

Fuente: Maccheroni (2007).

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones:

Una desnaturalización inicial de cinco minutos a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 64 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos más una extensión final de 72 °C por seis minutos. Para cada uno de los marcadores se esperaba la amplificación de fragmentos que varían entre los 100 pb hasta los 1500 pb.

5.5.5 Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida

La electroforesis se llevó a cabo en dos cámaras de sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) con una capacidad cada una de cuatro geles por cámara y peines de 10 y 15 pozos. Los geles se prepararon con una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 37.5:1 (40%), TBE (trisma base, ácido bórico y ácido etilendiaminotetraacético) 5X, agua destilada, temed y APS (persulfato de amonio). Las cámaras se llenaron con TBE1X y se corrieron los productos de PCR durante 90 minutos a 110 voltios con una escalera de 1500 pb como referencia.

Los geles se tiñeron con nitrato de plata que implica: una fijación por 20 minutos con ácido acético 10%, tres lavados de dos minutos con agua destilada, la tinción con nitrato de plata (AgNO_3 0.1% p/v, formaldehído 0.15% v/v) por 30 minutos, un lavado rápido con agua destilada de 10 segundos, el revelado con una solución fría de carbonato de sodio (NaCO_3 3% p/v, formaldehído 0.15%, tiosulfato de sodio 0.00052%) hasta la aparición de bandas definidas y, finalmente, la detención del revelado con ácido acético al 10%.

5.6 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los geles se escanearon y se analizaron utilizando el programa Total Lab TL120. A partir de los patrones de bandas visualizados en los geles se codificó la información alélica en una matriz binaria de ausencia y presencia, la cual se utilizó para determinar el contenido de información polimórfica (PIC) por medio de la siguiente fórmula: $1 - (a)^2 + (b)^2$ donde "a" es la frecuencia del alelo presente y "b" la frecuencia del alelo ausente, además con la matriz binaria se obtuvo el porcentaje de bandas polimórficas y el número de alelos observados en cada marcador. Además, se realizó un análisis de similitud basado en el coeficiente de Dice:

$$S_{ij} = 2A/(2A+B+C)$$

Donde:

S_{ij} es la similitud entre los individuos i y j .

A es el número de bandas presentes en ambos individuos i y j .

B es el número de bandas presentes en i pero ausentes en j .

C es el número de bandas en j pero ausentes en i .

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de conglomerados con la ayuda del software NTSys y se construyó un dendrograma basado en el método de agrupamiento UPGMA. Adicionalmente la información fue analizada con el software Popgene para obtener el porcentaje de información polimórfica, el número de bandas polimórficas y el número de loci y alelos observados y el número efectivo de alelos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 SIMILITUD GENÉTICA

La amplificación de ADN por medio de la electroforesis vertical en geles de poliacrilamida permitió la obtención de bandas con los tres marcadores, de las cuales se analizaron aquellas cuyos tamaños oscilan entre los 88 y los 1269 pb en su mayoría las bandas seleccionadas para la evaluación fueron polimórficas como se observa en la Figura 1.

Dichas bandas polimórficas permiten la utilización de los marcadores CV para detectar diferencias dentro de la muestra de variedades evaluadas.

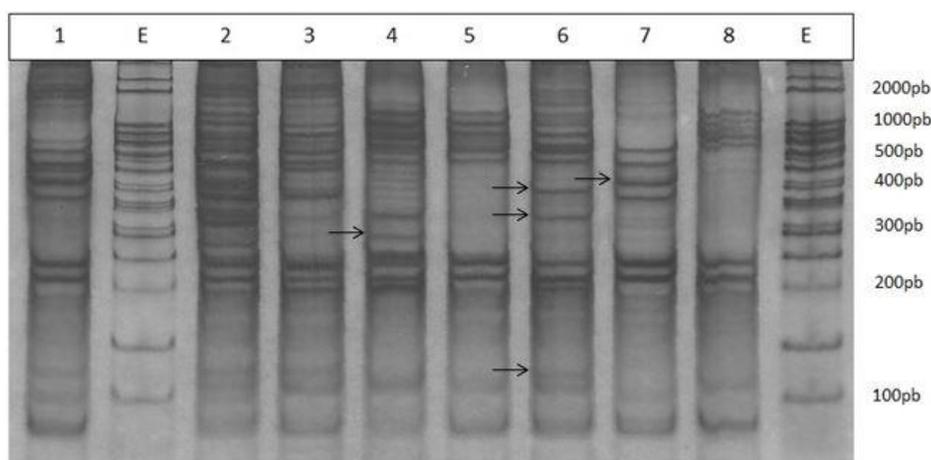


Figura 1 Gel de Poliacrilamida que muestra las bandas obtenidas con el marcador CV37. Carriles: E=escalera de peso molecular 50 pb 1= Q124, 2= San Felipe, 3=SP70-4768, 4= R570, 5= CG02-163, 6= CG01-53, 7= CP97-1931, 8= Mex79-431.

Según los resultados del análisis de los coeficientes de similitud, las variedades evaluadas tienen un coeficiente de al menos 0.52 esto comparado con los resultados de Pan, Scheffler, Richard (2007) sobre la evaluación de otros marcadores de secuencia simple repetida en otro grupo de variedades donde reportan una similitud mínima de 0.7 en una población de 116 variedades de caña de azúcar del Programa de mejoramiento de Luisiana, Estados Unidos, sugiere que existe mayor variabilidad genética en el grupo de variedades evaluadas en el presente trabajo. La similitud promedio de la muestra de

variedades fue de 0.62 y el índice de similitud más alto fue de 0.88 entre las variedades CP91-2087 y CP92-1780.

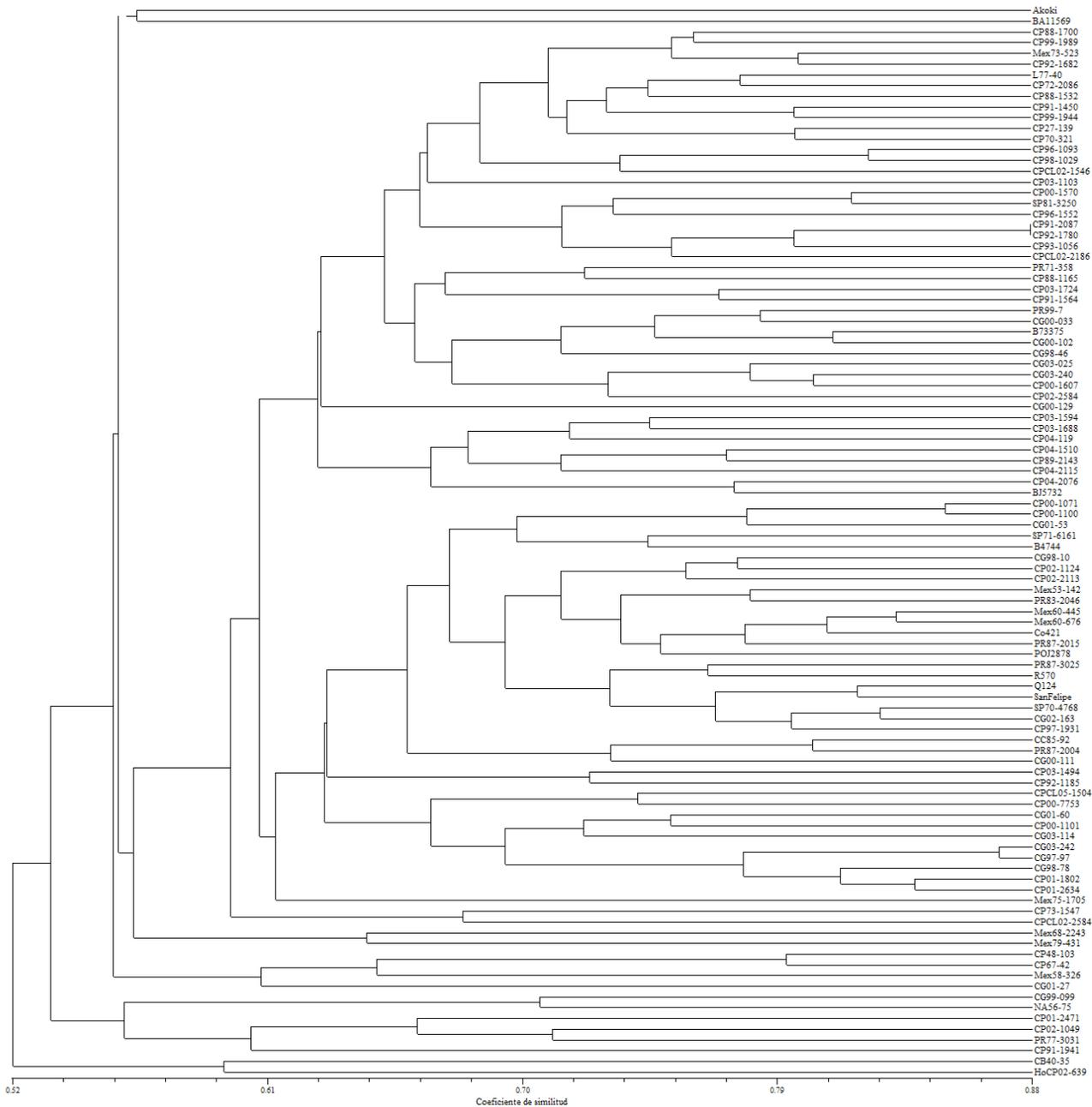


Figura 2. Dendrograma que describe las relaciones de similitud genética entre las 100 variedades de caña de azúcar, basado en el coeficiente de Dice.

Entre las variedades analizadas es posible observar agrupaciones en el dendrograma. En base a un coeficiente de similitud de 0.60 es posible contabilizar 10 grupos distintos de variedades.

Cuadro 3. Grupos 1 al 10 y su procedencia.

Grupo	Número de variedades	Procedencia	Coefficiente de Similitud de Dice
1	1	Hawaii (EUA)	0.557
2	1	Barbados	0.557
3	82	Argentina, Australia, Barbados, Brasil, Canal Point (EUA), Colombia, Guatemala, India, Java, México, Puerto Rico, Reunión,	0.595
4	2	Canal Point (EUA)	0.595
5	2	México	0.56
6	4	Canal Point (EUA), Guatemala y México	0.556
7	2	Argentina y Guatemala	0.535
8	4	Canal Point(EUA) y Puerto Rico	0.535
9	1	Brasil	0.52
10	1	Luisiana (EUA)	0.52



Figura 3. Variedades de los grupos 1 y 2.

El grupo 1 contiene únicamente la variedad Akoki, la cual es un clon de *Saccharum officinarum* de origen hawaiano que tiene un coeficiente de similitud de 0.56 con respecto al grupo 2, formado solo por la variedad BA11569 (Figura 3). Los resultados son similares a los reportados por Schenck *et al*, (2004) en donde en una evaluación de la diversidad genética y relaciones entre variedades nativas de caña de azúcar en Hawaii, la variedad Akoki, junto a otras 42 variedades nativas, se diferenciaron de las variedades comerciales modernas de Hawaii en un 45%, sosteniendo la teoría de que dichas variedades nativas pudieron ser introducidas por los nativos hawaianos antes de la llegada de los cultivares modernos.

El grupo 2 contiene únicamente a la variedad BA11569 que, según el dendrograma, tiene una similitud de 0.57 respecto al resto de variedades. Dicha variedad es originaria de Barbados y surge en el programa de fitomejoramiento desarrollado por Bovell a principios del siglo XX (Heinz, 1987).

El grupo 3 aglutina 82 de las 100 (82 %) variedades evaluadas, dentro de las cuales se encuentra POJ2878, variedad creada por holandeses en la isla de Java resultado de cruces realizados en 1921, esta variedad tiene mucha importancia debido a que en tan solo 8 años se sembró en 400,000 acres solo en Java con un incremento en el rendimiento de hasta el 35% (Heinz, 1987).

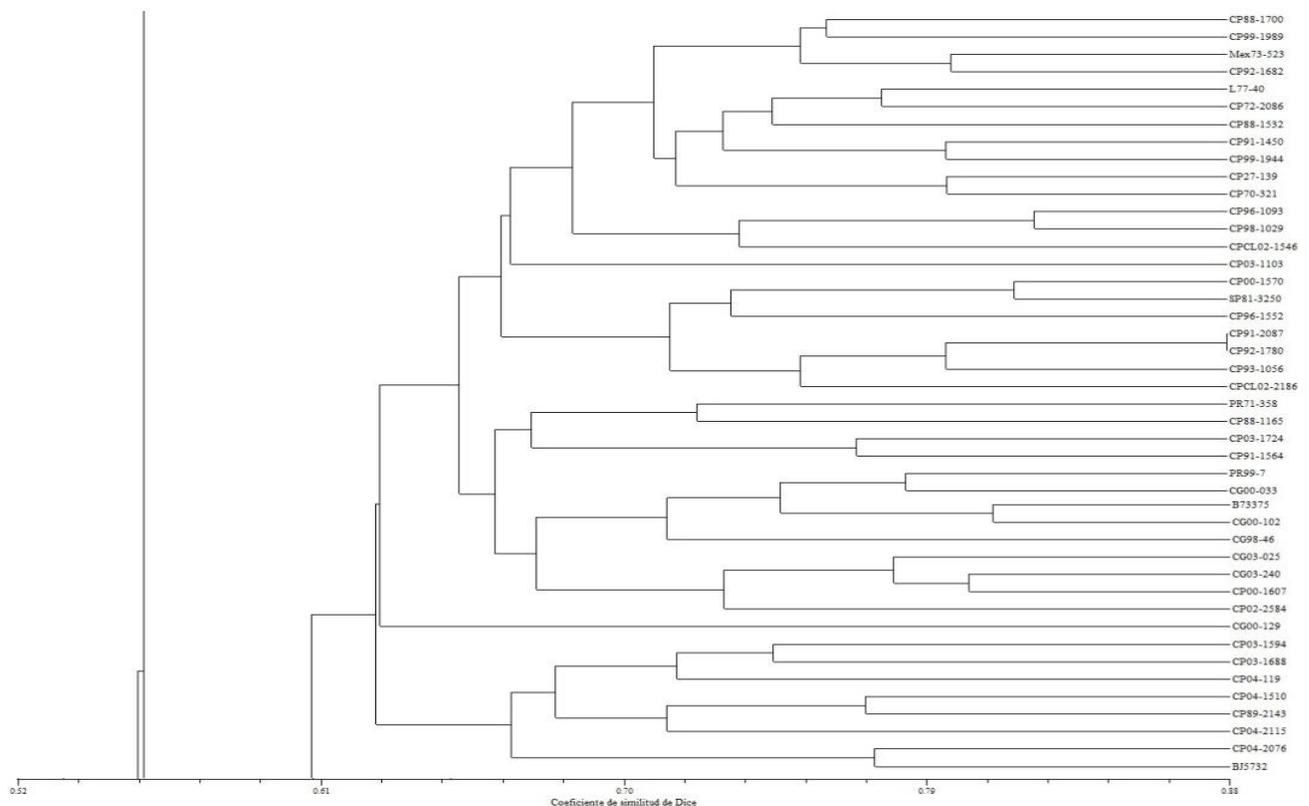


Figura 4. Variedades del grupo 3 (primera parte).

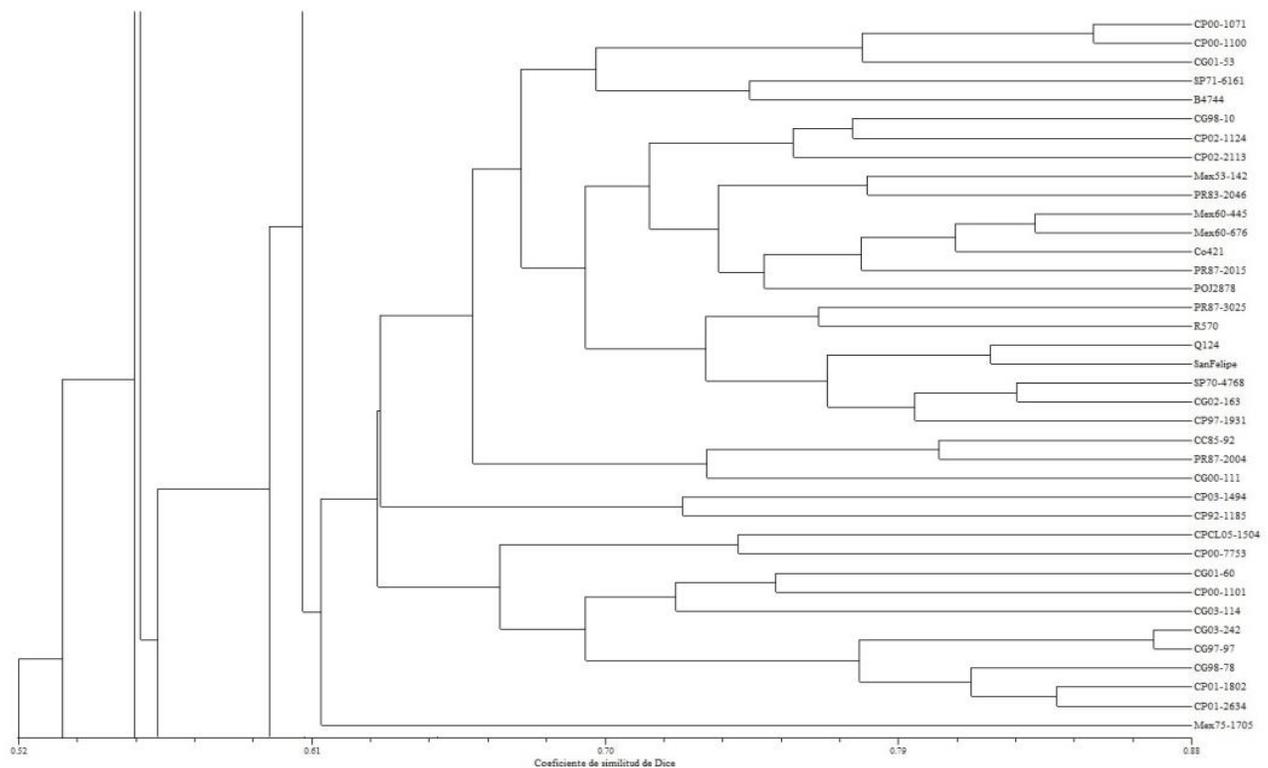


Figura 5. Variedades del grupo 3 (segunda parte).

POJ2878 también fue utilizada en programas de mejoramiento de todo el mundo y podría formar parte del pedigrí de el resto de variedades del grupo como la variedad Co421, resultado del cruce entre POJ2878 x Co285 o la variedad CC85-92 que tiene como progenitor a Co775, que a su vez, surgió del cruce entre la variedad POJ2878 y la Co371.

En relación a las variedades de Estados Unidos, 43 de un total de 52 (83 %) presentes en el análisis se encuentran en el grupo 3, mientras que de las variedades guatemaltecas, 15 de 17 (88 %) están en ese mismo grupo.

Los grupos del 4 al 10 son conglomerados de pocas variedades de distintas procedencias con características particulares que las hacen menos similares a los grupos 1, 2 y 3.

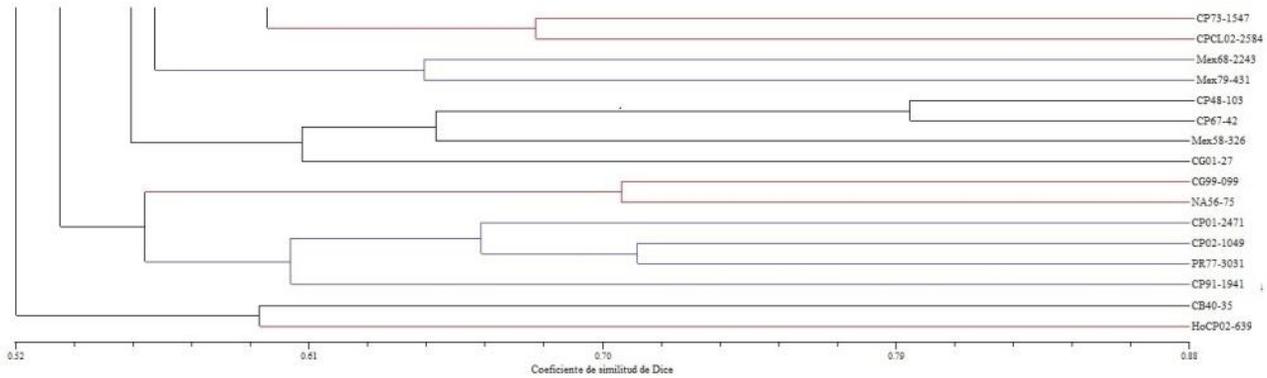


Figura 7. Variedades de los grupos 4 a 10.

Da Silva, Sorrells, Burnquist y Tanksley (1993) mencionan que la caña de azúcar moderna es un cultivo muy complejo genéticamente, por lo que su mejoramiento genético en el ámbito tradicional es problemático; Es precisamente por esta razón por la cual es importante la generación de información confiable para facilitar los procesos de cruzamientos y selección de variedades. La caracterización molecular permitió entonces evaluar las variedades en relación a sus características genéticas y compararlas entre sí. La colección de variedades de CENGICANÑA cuenta con 2040 variedades, de las cuales se seleccionaron 100 para el presente análisis con base en características de importancia para el programa de fitomejoramiento. En su mayoría las variedades evaluadas han sido introducidas del programa de mejoramiento de Canal Point (Florida, EUA) debido a que han demostrado una alta adaptabilidad a la zona cañera de Guatemala, como es el caso de CP72-2086, CP73-1547 y CP88-1165 que han llegado a ocupar más de 70 % del área cultivada en el país. En la figura 6 se observa que ambos grupos de variedades estadounidenses y guatemaltecas se agrupan de manera cercana y su dispersión es similar.

6.2 CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA

El contenido de información polimórfica es una medida de la informatividad de un marcador genético que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. En el cuadro 4 se observan las frecuencias alélicas para cada uno de los alelos de cada uno de los locus. De manera general el contenido de información polimórfica fue 0.366, 0.3485 y 0.3652 para los iniciadores CV29, CV37 y CV38 respectivamente. El rango de contenido de información polimórfica de un locus cualquiera que se analice como dominante oscila entre 0.0 y 0.5 por lo que los marcadores CV29, CV37 y CV38 pueden considerarse como altamente informativos.

Cuadro 4. Frecuencias alélicas y PICs CV29.

Primers CV29											
Loci evaluados	21										
Loci	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
frecuencia alélica	0	0	0.5099	0.4243	0.3742	0.5916	0.6633	0.5831	0.6557	0.7416	0.5568
frecuencia alélica	1	1	0.4901	0.5757	0.6258	0.4084	0.3367	0.4169	0.3443	0.2584	0.4432
PIC	0.000	0.000	0.500	0.489	0.468	0.483	0.447	0.486	0.452	0.383	0.494
Loci	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
frecuencia alélica	0.8000	0.7874	0.7000	0.6633	0.7746	0.8660	0.2646	0.4899	0	0.4359	
frecuencia alélica	0.2000	0.2126	0.3000	0.3367	0.2254	0.1340	0.7354	0.5101	1	0.5641	
PIC	0.320	0.335	0.420	0.447	0.349	0.232	0.389	0.500	0.000	0.492	

Cuadro 5. Frecuencias alélicas y PICs CV37

Primers CV37											
Loci evaluados	26										
Loci	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
frecuencia alélica	0.8367	0.7746	0.6325	0.5568	0.5568	0.7348	0.8367	0.8185	0.7550	0.8246	0.8246
frecuencia alélica	0.1633	0.2254	0.3675	0.4432	0.4432	0.2652	0.1633	0.1815	0.2450	0.1754	0.1754
PIC	0.2733	0.3492	0.4649	0.4935	0.4935	0.3897	0.2733	0.2971	0.3700	0.2893	0.2893
Loci	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
frecuencia alélica	0.7616	0.8124	0.7681	0.3873	0.5568	0.6928	0.8000	0.8602	0.7810	0.9220	0.7616
frecuencia alélica	0.2384	0.1876	0.2319	0.6127	0.4432	0.3072	0.2000	0.1398	0.2190	0.0780	0.2384
PIC	0.3631	0.3048	0.3562	0.4746	0.4935	0.4257	0.3200	0.2405	0.3421	0.1438	0.3631
Loci	23	24	25	26							
frecuencia alélica	0.5745	0.7681	0.2828								
frecuencia alélica	0.4255	0.2319	0.7172	1							
PIC	0.4889	0.3562	0.4056	0.0000							

Cuadro 6. Frecuencias alélicas y PICs CV38

Primers CV38											
Loci evaluados	18										
Loci	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
frecuencia alélica				0.5099	0.6557	0.6708	0.4472	0.5000	0.6245	0.5385	0.6708
frecuencia alélica	1	1	1	0.4901	0.3443	0.3292	0.5528	0.5000	0.3755	0.4615	0.3292
PIC	0.0000	0.0000	0.0000	0.4998	0.4515	0.4417	0.4944	0.5000	0.4690	0.4970	0.4417
Loci	12	13	14	15	16	17	18				
frecuencia alélica	0.8124	0.8367	0.3873	0.6782	0.7211	0.5657	0.7280				
frecuencia alélica	0.1876	0.1633	0.6127	0.3218	0.2789	0.4343	0.2720				
PIC	0.3048	0.2733	0.4746	0.4365	0.4022	0.4914	0.3960				

6.3 PORCENTAJE DE BANDAS POLIMÓRFICAS

Con base en la información obtenida de la codificación de las bandas se logró determinar la eficiencia de los tres marcadores para detectar polimorfismos. El 89.23% de los loci evaluados resultaron ser polimórficos para esta población. En total únicamente siete loci fueron monomórficos como se observa en el cuadro 5.

Cuadro 7. Resultados de la evaluación de los marcadores CV29, CV37 y CV38.

Marcador	No. De loci	Rango (pb)	No. Alelos Monomórficos	% alelos Polimórficos	ne	PIC
CV29	21	88 – 910	3	85.71%	1.66	0.366
CV37	26	101 - 1269	1	96.15%	1.58	0.348
CV38	18	120 - 1190	3	83.33%	1.67	0.365
Total	65				1.64	0.359

ne = número efectivo de alelos, PIC = contenido de información polimórfica.

6.4 NÚMERO DE LOCI, NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS y NÚMERO EFECTIVO DE ALELOS

En el cuadro 5 se observan los resultados de la evaluación de cada marcador. En total se evaluaron 65 loci (en promedio 22 loci por marcador) resultados similares a los obtenidos por Maccheroni *et al.* (2007) donde reportan un total de 59 loci y 20 loci en

promedio para cada marcador. El número de alelos observados fue de 39, 51 y 33 para CV29, CV37 y CV38 respectivamente. El número efectivo de alelos promedio para los tres marcadores fue de 1.64. El número efectivo de alelos permite medir la heterocigosidad en la muestra, este no es más que el número de alelos igualmente frecuentes por locus. Para este caso específico existiendo dos alelos por locus el rango del número efectivo de alelos oscila entre 1 y 2, por lo tanto el promedio para los tres marcadores evaluados se encuentra por encima de la media, lo que significa que existe heterocigosidad en la muestra de variedades evaluadas.

VII. CONCLUSIONES

Se determinó que existe al menos un 52% de similitud genética en el grupo de 100 variedades de caña de azúcar mediante el uso de tres marcadores de secuencia simple repetida.

El contenido de información polimórfica (PIC) de cada marcador fue 0.366, 0.3485, 0.3652 para el marcador CV29, CV37 y CV38, respectivamente.

El porcentaje de bandas polimórficas de cada marcador fue 85.71%, 96.15% y 83.33% para CV29, CV37 y CV38, respectivamente.

El número de loci observados en cada marcador fue 21, 26 y 18 para los marcadores CV29, CV37 y CV38, respectivamente, y el número de alelos observados fue de 39, 51, 33 para CV29, CV37 y CV38 respectivamente, su número efectivo de alelos fue 1.66, 1.57 y 1.66, respectivamente.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda tomar en cuenta los grupos de variedades identificados en el presente trabajo para la programación de cruzamientos que tiendan a obtener altos niveles de diversidad genética en las progenies.

Se recomienda evaluar distintos marcadores para comparar con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, K. Jackson, P. McIntyre, C. (2005). A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous groups in a sugarcane cultivar. *Theoretical and applied genetics*, 789-801.
- Al-janabi, S. Honeycutt, R. McClelland, M. Sobral, B. (1993). A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. "SES 208". *Genetics*, 1249-1260.
- Autor desconocido (n.d) obtenido el 23 de septiembre del 2014 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>
- Cox, M. Hogarth, M. Smith, G. (2000). Cane breeding and improvement. in Hogarth, D. M. and Allsop, P. G. ed. *Manual of Canegrowing*, Brisbane, 91-108.
- D'Hont A. Grivet L. Feldman P. Rao S. Berding N. Glaszmann J-C. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* 405-413.
- D'hont, A. Ison, D. Aliz, K. Roux, C. Glaszmann, J.C. (1998). Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping or ribosomal RNA genes. *Genome Res*, 221-225.
- D'hont, A. Mendes Souza G. Menossi M. Vincentz M. Van Sluys M.A. Glaszmann J.C. Ulian E.C. (2008). Sugarcane: A major source of sweetness, alcohol, and Bio-energy. Springer. 2008. *Genomics of tropical crop plants*. Springer. 483-513.
- Da Silva, J. Sorrells, M. Burnquist, W. Tanksley, D. (1993). RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome*. 782-791.
- Heinz, J. (1987). *Sugarcane Improvement Through Breeding*. Development in crop science. Elsevier Science publishers B.V.
- Hoarau, J. Offman, B. D'Hont, A. Risterucci, A. Roques, D. Glaszmann, J. (2001). Genetic dissection of a modern cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP. *Theoretical and applied Genetics*, 84-97.
- Kahl, G. (2001), *The Dictionary of Gene Technology*. Genomics, Transcriptomics, proteomics, second edition, WILEY-VCH. p. 928
- Karp, A. Edwards, K. (1998). DNA markers: A global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M. eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Gress-hoff. New York, 1-13.

- Karp, A. Kresovich, S. Bhat, K. Ayad, W. Hodgkin, T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma, Italia. p. 47
- Lakshmanan, 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*. P 345-363
- Lee, M. (1995). DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron*, 265.344.
- Maccheroni, W. Jordao, H. Degaspari, R. Matsuoka, S. (2007). Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane, Canavialis S.A, Campinas, SP, Brazil.
- Maldonado, A. Quemé, J.L. Ovalle, W. (2006) Desarrollo de marcadores tipo AFLP para determinar Resistencia genética a *Puccinia melanocephala* H. Syd. & Syd. (Roya marron de la caña) en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) Presentación de resultados de investigación Zafra 2005-2006
- Melgar, M. (2012) Desarrollo tecnológico de la agroindustria azucarera y perspectivas; El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala; Melgar, M.; Meneses, A.; Orozco, H.; y Espinosa, R. (eds.). Guatemala.
- Molina, L. Ávalos, A. Quemé, J.L. Maddaleno, C. (2014). Caracterización molecular de 55 variedades de caña de azúcar mediante marcadores microsatélite. Presentación de resultados Zafra 2013-2014.
- Molina, L. Ávalos, A. Quemé, J.L. Maddaleno, C. (2014). Caracterización molecular de 43 variedades de caña de azúcar mediante marcadores microsatélite. Presentación de resultados Zafra 2013-2014.
- Molina, L. Melgar, M. (2012). Antecedentes del desarrollo biotecnológico en caña de azúcar; El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala; Melgar, M.; Meneses, A.; Orozco, H.; y Espinosa, R. (eds.). Guatemala p. 512.
- ONU. (1992). Convenio sobre la diversidad biológica. Recuperado el 21 de junio de 2011, de <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- Pan, Y. Scheffler, B. y Richard, E. jr. (2007) High throughput genotyping of commercial sugarcane clones with microsatellite (SSR) DNA markers. Society for Sugar Research and Promotion.

- Parida, S. Kalia, K. Kaul, S. Dalal, V. Hemaprabha, G. Selvi, A. Pandit, A. Singh, A. Gaikwad, K. Sharma, T. Srivastava, P. Singh, N. Mohapatra, T. (2008). Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. National Research Centre on Plant Biotechnology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.
- Phillips, W. Rodríguez, H. Fritz, P. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- Quemé, J.L. Molina L. Melgar, M. (2005). Analysis of genetic similarity among 48 sugarcane varieties using microsatellite DNA sequences. Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists 25, 592-596.
- Roughan, P. Waldron, J. Glasziou, K. (1971). Starch inheritance in *saccharum*. Enzyme polymorphism for β -amylase in interspecific and intergeneric hybrids. Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists, 257-265.
- Schenck, M. Crepeau, W. Wu, K. Moore, P. Yu, Q. Ming, R. (2004), Genetic Diversity and Relationships in Native Hawaiian *Saccharum officinarum* Sugarcane S. Journal of Heredity 2004:95(4):327–331.
- Sreenivasan, T.V. Ahloowalia, B.S. Heinz, D. (1987). Cytogenetics. In Sugarcane improvement through breeding. Ed. Heinz. Elsevier Science. p 211-253.
- Valadez, M; Kahl, G (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México D.F.
- Varshney, R. Graner, A. Sorrells, M.E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotechnol, 48-55.
- Waugh, R. Powell, W. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. Trends Biotechnol, 186–191.
- Welsh, J. McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res, 7213–7218.
- Williams J.G.K. Kubelik A.R. Livak K.J. Rafalski J.A. Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 6531–6535.
- Wu, L. Birch, B.G. (2007). Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. Plant Biotechnology Journal, 109-117.