

Caracterización molecular de variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco, México

Vianey González-Jiménez¹, Apolonio Valdez Balero¹, Fernando Carlos Gómez Merino², Hilda Victoria Silva Rojas², Julián Pérez Flores¹, Carlos Fredy Ortiz García¹. *Autor para correspondencia

¹Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n, H. Cárdenas 86 500, Tabasco, México. e-mail: apoloniouvb@colpos.mx

²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5 Montecillo 56 230 Estado de México

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente la variabilidad genética en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas en el estado de Tabasco, México, mediante AFLP. Se utilizaron 12 variedades de caña de azúcar de las cuales se tomaron hojas jóvenes de plantas en campo. Después de realizar 12 combinaciones de cebadores, los resultados indicaron que la combinación E-ACC/M-CTA produjo fragmentos polimórficos de 72 a 1353 pb. El dendrograma reveló dos grupos distintos de *Saccharum* spp. y una variedad que se diferenció de ambos. El grupo I comprendió las variedades C 87-51, ATM 96-40, B 4362, Mex 69-290, Mex 57-1285 y Mex 91-130, que formaron un conglomerado y presentaron una similitud del 0.77%. El grupo II comprendió las variedades RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, Mex 59-32 y CP 72-2086 las cuales conformaron otro conglomerado con 0.70%. La variedad Mex 68-P-23 se diferenció de las otras 11 variedades.

Palabras clave: ADN, AFLP, marcadores moleculares

ABSTRACT

To characterize varieties in recent years have used different types of morphological, biochemical and molecular methods. The aim of this study was to characterize molecular genetic variability in varieties of sugarcane (*Saccharum* spp.) grown in the state of Tabasco, Mexico, by AFLP. It was used 12 varieties of sugarcane. Young leaves of plants growing in the field were selected for experiment. After making 12 combinations of primers, the results indicated that the combination E-ACC/M-CTA produced 72 to 1353 bp polymorphic fragments. The dendrogram revealed two distinct groups of *Saccharum* spp. and a variety that differed from both. Group I comprised the varieties C 87-51, 96-40 ATM, B 4362, 69-290 Mex, Mex Mex 91-130 and 57-1285, which formed a cluster and showed a similarity of 0.77%. Group II included the varieties RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, 72-2086 and CP Mex 59-32 which formed another cluster with 0.70%. The variety Mex 68-P-23 differed from the other 11 varieties.

Keywords: DNA, AFLP, molecular markers

INTRODUCCIÓN

El aumento en la producción mundial de azúcar se debe a la introducción de cultivares mejorados (Jackson, 2005). Los cultivares modernos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) plantados en el mundo resultaron del inter cruzamientos a partir de la primera cruce interespecífica llevada a cabo al principio del siglo pasado, entre *S. officinarum*, *S. spontaneum* y *S. barberi* (Grivet y Arruda, 2002). En las últimas décadas diferentes autores han señalado la

necesidad de crear germoplasma nuevo que posea un mayor rendimiento de azúcar, alta resistencia a los factores abióticos y bióticos y que sea de fácil manejo agronómico (Lu *et al.*, 1994, Baksha *et al.*, 2002).

Saccharum officinarum es una especie octoploide con un número cromosómico $2n=70$ a 140 (Irvine, 1999). Por tal razón, se piensa que los clones comerciales son el producto de numerosas hibridaciones con números cromosómicos elevados $2n = 100$

a 130 debido a fenómenos de euploidía y aneuploidía (Grivet y Arruda, 2001). Por estas razones, la caracterización de las variedades de caña de azúcar es un aspecto importante en la generación de nuevas variedades.

Para la caracterización de variedades, en los últimos años se ha utilizado diferentes tipos de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los marcadores más utilizados para la caracterización de plantas son los bioquímicos y los marcadores basados en ácido desoxirribonucleico (ADN), entre los que se pueden citar: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, del inglés: *restriction fragment length polymorphism*), Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD, del inglés: *Random Amplification of Polymorphic DNA*), Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados, (AFLP, del inglés: *Amplified Fragment Length Polymorphic*) y Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR, del inglés: *Short Sequence Repeat*).

Mediante la amplificación de ADN por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) estos marcadores permiten la identificación y el aislamiento de genes de interés y se están utilizando en el trazado genético de la caña de azúcar (Hoarau *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2003), así como en la deducción de inferencias

acerca de la variabilidad genética y las interrelaciones entre los genotipos a nivel de ADN (Lima *et al.*, 2002; Cordeiro *et al.*, 2003). Entre estos trabajos se destaca la construcción de mapas genéticos en variedades comerciales (Aitken *et al.*, 2005).

Los marcadores moleculares tipo AFLP combinan las tecnologías de RFLP y de PCR. Esta técnica consiste en la amplificación de múltiples regiones arbitrarias del genoma (Vos *et al.*, 1995). Además, se ha utilizado con éxito para la obtención de marcadores moleculares distribuidos en genomas de eucariontes, así como en plantas cultivadas que presentan una baja tasa de polimorfismo de ADN, ya que tienen la capacidad de amplificar un gran número de loci a lo largo del genoma. Además, se utilizan en la detección y evaluación de la variación genética en colecciones de germoplasma y el estudio de la biodiversidad (Vuylsteke *et al.*, 2000). Por tal motivo esta técnica fue elegida para caracterizar molecularmente variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variedades de caña de azúcar

Se utilizaron 12 variedades de caña de azúcar del banco de germoplasma ubicado en el campo experimental del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco (Tabla 1).

Tabla 1. Variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas en el estado de Tabasco,, México, utilizadas para determinar su variabilidad genética.

Variedad	Progenitores	País de origen
C 87-51	Co 281 x POJ 2878	Cuba
Mex 57-1285	CP 52-43 X CB 45-6	México
Mex 59-32	B 35-187 x CP 34-120	México
Mex 91-130	Mex 57-280 x Mex 72-161	México
ATM 96-40	SP 70-6180 x Mex 79-431	México
RD 75-11	CB 38-22 X CP 57-603	República Dominicana
Mex 79-431	Co 421 x Mex 57-473	México
B 4362	B 37-161 x POJ 2878	Barbados
Mex 69-290	Mex 56-476 x Mex 53-142	México
SP 70-1284	CB 41-76 X ?	Brasil
CP 72-2086	CP 62-374 x CP 63-588	Estados Unidos
Mex 68-P-23	Mex 59-84 x ?	México

Las muestras, para ser procesadas en el laboratorio, se tomaron de hojas jóvenes de plantas en campo de acuerdo con la metodología recomendada por el protocolo del laboratorio de genética molecular aplicada del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (2006).

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se empleó el método descrito por Baidrige *et al.* (1990). Posteriormente, se determinó la concentración de ADN mediante la lectura por espectrometría. Se igualaron las concentraciones de todas las muestras a 100 ng μl^{-1} . El procedimiento para la realización de los AFLPs, siguió las recomendaciones indicadas en el Kit AFLP® *Analysis System I* y AFLP® *Starter Primer Kit* (Invitrogen™, Carlsbad, CA).

Digestión genómica del ADN

El ADN genómico fue digerido usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*. Se hizo una mezcla de 5X de reacción Buffer (5 μl), ADN control de tomate (100 ng en 5 μl (2.5 μl), muestra de ADN (250 ng en 18 μl), *EcoRI/MseI* (2 μl), agua destilada (15.5 μl) para un volumen final de 25 μl . Se incubó a 37°C por 2 h.

Ligación de adaptadores

Para la ligación se hizo una dilución 1:5, con 24 μl de adaptadores solución de la ligación y 1 μl de T4 ADN ligasa.

Pre-amplificación

La pre-amplificación se realizó con una dilución 1:10 de la mezcla Primer Mix (40 μl), 10 X PCR buffer plus Mg (5.0 μl), *Taq* ADN polimerasa (1 μl). La solución resultante fue llevada a un termociclador ADN (Engine Peltier Thermal Cycler de Bio-Rad), previamente programado para 20 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. De la pre amplificación se prepararon diluciones 1:10 con agua para AFLP (Sigma).

Amplificación selectiva

De acuerdo con las recomendaciones del fabricante se buscaron posibles combinaciones para encontrar las que dieran mejor patrón de bandeo y así poder diferenciar las 12 variedades de caña de azúcar (Tabla 2).

Análisis de datos

A partir de los patrones electroforéticos obtenidos de las pruebas moleculares, se evaluaron las bandas de forma binaria considerando el valor 0 como ausencia y 1 como presencia. A partir de las matrices de los datos originales, se calculó el coeficiente de similitud genética entre cada par de genotipos, utilizando solo las bandas polimórficas, mediante el paquete estadístico NTSys PC 2.0 (dendrograma y matriz de distancias genéticas).

Tabla 2. Combinaciones de iniciadores utilizadas para la caracterización molecular de 12 variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas en el estado de Tabasco, México.

No. Combinaciones	Combinación de iniciadores <i>EcoR I/Mse I</i>
1	E-AAC/M-CAC
2	E-AAG/M-CTC
3	E-ACA/M-CTT
4	E-ACC/M-CTA
5	E-AAC/M-CAG
6	E-AAC/M-CTG
7	E-ACC/M-CTG
8	E-ACG/M-CAC
9	E-ACG/M-CAA
10	E-ACT/M-CTC
11	E-AGC/M-CAT
12	E-AGG/M-CAT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de la evaluación de las 12 combinaciones de iniciadores se encontró que la combinación E-ACC/M-CTA fue la que mostró mayor polimorfismo entre variedades. El tamaño de los fragmentos polimórficos detectados con esta combinación de cebadores osciló desde 72 hasta 1353 pb (Figura 1).

El escaso polimorfismo detectado indica la estrecha base genética de las 12 variedades evaluadas cultivadas en el estado de Tabasco, México. Lo cual puede deberse a que el género *Saccharum* se caracteriza por una alta poliploidía y una aneuploidía frecuente (Grivet y Arruda, 2001). Además, la caña de azúcar tiene un genoma complejo que va de 2500 a 4000 millones de pares de bases (Mbp 1C) (Arumuganathan y Earle, 1991). Solo *S. officinarum* tiene un genoma de ADN cloroplástico de 141182 pb (Asano *et al.*, 2004; Calsa *et al.*, 2004).

Otra razón del poco polimorfismo observado puede deberse a que los cruzamientos entre genotipos se enfocan principalmente a la generación de variedades con resistencia a plagas y enfermedades (Harvey *et al.*, 1994).

Estos han sido exitosos y han originado variedades de caña de azúcar más productivas pero con una marcada reducción en su base genética (Jannoo *et al.*, 1999).

La técnica de AFLP ha mostrado resultados exitosos en caña de azúcar en varios países. Estudios realizados en Brasil, con 79 cultivares detectaron un promedio de 50% de 52% de polimorfismo entre 28 cultivares, cuando utilizaron 12 combinaciones (Lima *et al.*, 2002). En la India, se informó de un promedio de 52% de polimorfismo entre 28 cultivares, utilizando 12 combinaciones (Selvi *et al.*, 2006).

Por otra parte, en México, Rodríguez *et al.* (2005) caracterizaron las 15 variedades más utilizadas en la producción de caña de azúcar, mediante 12 combinaciones de AFLP. Sus resultados generaron un total de 884 marcadores, de los cuales 55.3% fueron polimórficos. Las variedades Mex 73-523 y Mex 68-P-23 se ubicaron en las ramas más alejadas del dendrograma y aparecen como no unidas a otras variedades.

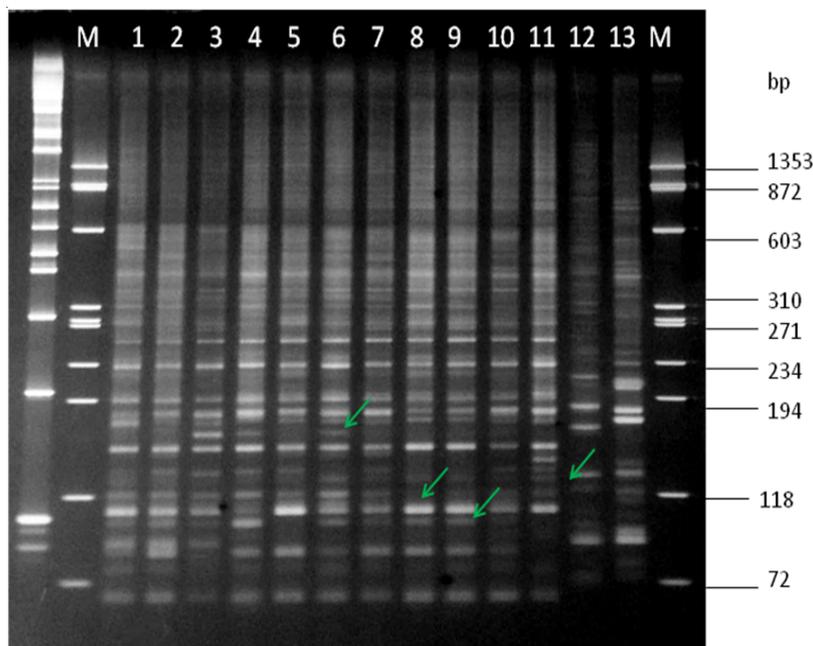


Figura 1. Combinación E-ACC/M-CTA. Variedades: 1) C 87-51; 2) Mex 57-1285; 3) Mex 59-32; 4) Mex 91-130; 5) ATM 96-40; 6) RD 75-11; 7) Mex 79-431; 8) B 4362; 9) Mex 69-290; 10) SP 70-1284; 11) CP 72-2086; 12) Mex 68-P-23; 13) control +; M) Marcador (ϕ X 174/Hae-III). (Las flechas indican la dispersión de las bandas polimórficas).

Igualmente, Raboin *et al.* (2008) hicieron un estudio en 72 clones de *Saccharum* spp. utilizando la técnica de AFLP. Estos autores encontraron 1.537 marcadores polimórficos con 42 combinaciones. De estos marcadores, solo 463 fueron localizados en el mapa genético.

El dendrograma reveló dos grupos distintos de *Saccharum* spp. y una variedad que se diferenció de ambos grupos (Figura 2). El grupo I comprendió las variedades C 87-51, ATM 96-40, B 4362, Mex 69-290, Mex 57-1285 y Mex 91-130, las cuales presentaron un 0.77% de similitud genética. Esto representa una mayor cercanía genética, entre variedades comparadas con las variedades del grupo II. El grupo II comprendió las variedades RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, Mex 59-32 y CP 72-2086, las cuales formaron un conglomerado con un 0.70% de similitud genética.

La variedad Mex 68-P-23, fue la que presentó una menor similitud genética con un 0.22% con el resto de las variedades analizadas.

Rodríguez *et al.* (2005), encontraron que genotipos de caña de azúcar constituyeron una población genéticamente estrecha y que

la variedad Mex 68-P-23 fue una de las que mostró una mayor distancia genética. Lo anterior puede indicar un incremento en la variabilidad genética, la cual es indispensable para el mejoramiento genético. Estos resultados coinciden con los numerosos estudios de caña de azúcar que han demostrado la estrecha base genética de los cultivares modernos (Grivet *et al.*, 1996; Canales *et al.*, 2003).

Estudios realizados en genotipos de caña de azúcar han demostrado que existe un pequeño grado de diversidad a nivel del ADN entre las variedades modernas (Arro, 2005). En Cuba, también se encontró que las variedades comerciales de caña de azúcar actuales presentan baja variabilidad genética entre ellas (Arencibia *et al.*, 2006).

Lo anterior y los resultados de la presente investigación pueden explicarse también porque los cruces de los cultivares modernos utilizados como progenitores de las primeras cruces fueron retrocruzados varias veces con *S. officinarum* en un proceso conocido como «nobilización» dando como resultado que los nuevos híbridos mostraran una reducción en su base genética (Deren, 1995; Jannoo *et al.*, 1999).

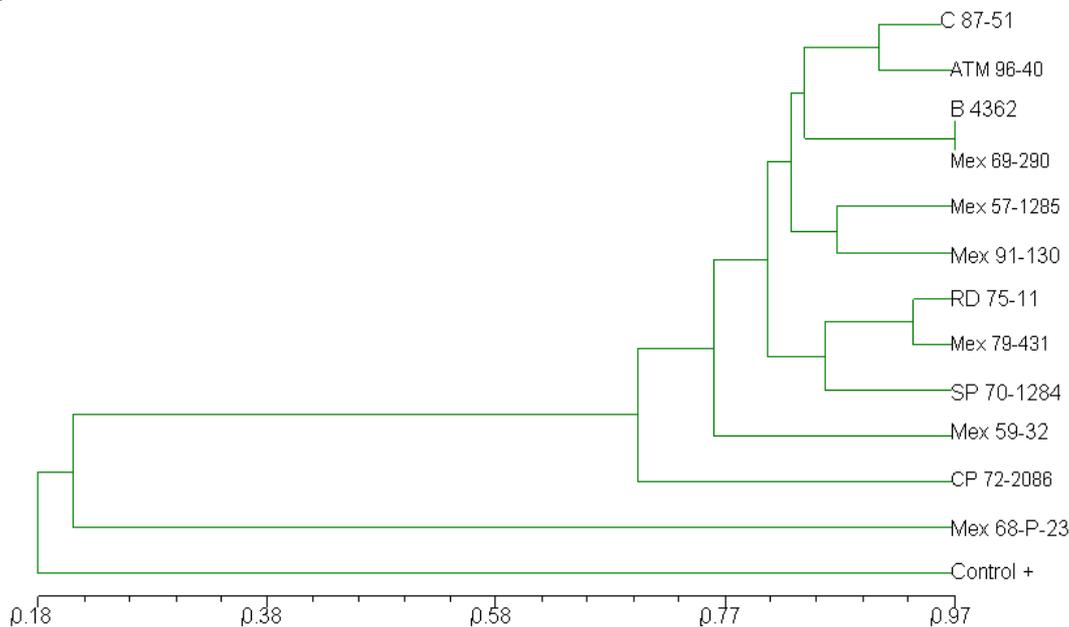


Figura 2. Análisis de agrupamiento basado en la similitud genética AFLP de 12 variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco, México mediante el programa NTSYS PC.

CONCLUSIONES

Los resultados confirman la utilidad de los AFLP para obtener el número necesario de marcadores para el análisis del genoma, así como la caracterización y detección de polimorfismos de 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco, México.

La combinación E-ACC/M-CTA fue la que produjo mayores fragmentos polimórficos. Se encontró que existe un pequeño grado de diversidad a nivel del ADN entre las variedades cultivadas en el estado de Tabasco, México. La variedad 68-P-23 presentó una distancia genética lejana con respecto al resto de las variedades analizadas.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco y a la Línea Prioritaria de Investigación 5 (LPI5) Biotecnología microbiana, vegetal y animal por el apoyo económico para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Aitken, KA, Jackson PA, McIntyre CL (2005) A combination of AFLP and SSR markers provide extensive map coverage and identification of homo (eo) logouts linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theor Appl. Genet.* 110: 789-701
- Arencibia, A, Delgado M, Jorge H, Coto O, Ibis J, García H (2006) Caracterización molecular de variedades cubanas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) mediante AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 29(001): 19-25
- Arro, JA (2005) Genetic diversity among sugarcane clones using Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) markers and pedigree relationships. Masters Thesis submitted to Louisiana State University, Baton Rouge. 78p.
- Arumuganathan, K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218
- Asano, T, Tsudzuki T, Takahashi S, Shimada H, Kadowaki K (2004) Complete nucleotide sequence of the sugarcane (*Saccharum officinarum*) chloroplast genome: a comparative analysis of four monocot chloroplast genomes. *Oxford Journals. DNA Research* 11: 93-99
- Baindrige, B W, Spreadbury CL, Scalise FG, Cohen J (1990) Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *Microbiology Letter* 66: 113 – 118
- Baksha, R, Alam R, Karim MZ, Paul SK, Hossain MA, Miah MAS, Rahman ABMM (2002) *In vitro* Shoot Tip Culture of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Variety Isd 28. *Int. Quarterly J. Biotechnol.* 1: 67 – 72
- Calsa, JT, Carraro DM, Benatti MR, Barbosa AC, Kitajima JP, Carrer H (2004) Structural features and transcript-editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) chloroplast genome. *Curr Genet.* 46: 366-373
- Canales, E, Coto O, Cornide, MT (2003) Variación genética e identificación de cultivares cubanos de caña de azúcar mediante RFLP. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 34(3): 129 -136
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) (2006) Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México. D. F. p. 92
- Cordeiro, GM, Pan YB, Henry RJ (2003) Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* 165: 181-189
- Deren CW (1995) Genetic Base of U.S. Mainland Sugarcane. *Crop Science* 35:1195-1199
- Grivet, L, Arruda P (2001) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr Opin Plant Biol* 5: 122-127
- Grivet, L, Arruda P (2002) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 122-12
- Grivet, L, D'Hont A, Rodrigues D, Feldmann P, Lanaud C, Glaszmann JC (1996) RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* (3): 987
- Harvey, H, Hockett BI, Botha FC (1994) Use of Polymerase Chain Reaction and Random Amplification of Polymorphic DNAs for the determination of genetic distances between 21 sugarcane varieties. *South African Sugar Association* 68: 36-40
- Hoarau, JY, Grivet L, Offmann B, D'Hont A, Risterucci AM, Roques D, Glaszmann JC, Grivet L (2001) Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. *Theor Appl Genet* 103: 84-97
- Irvine, JE (1999) *Saccharum* species as horticultural classes. *Theor Appl Genet* 98:186-194

- Jackson, PA (2005) Breeding for improved sugar content in sugarcane. CSIRO Plant Industry, Davies Laboratory, Private Mail Bag, Aitkenvale, Qld. 4814, Australia. *Field Crops Research* 92: 277–290
- Jannoo, NL, Grivet M, Seguin F, Paulet R, Domaingue PS, Rao A, Dookun A, D'Hont A, Glaszmann JC (1999) Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theor Appl Genet* 99: 171-184
- Lima, M LA, García AAF, Oliveira KM, Matsuoka SH, Arizono CL, De Souza Jr AP, De Souza AP (2002) Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugarcane (*Saccharum* spp.) *Theor Appl Genet* 104: 30–38
- Lu, YH, D'Hont A, Walker DJT, Rao PS, Feldmann P, Glaszmann JC (1994) Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single-copy maize nuclear probes. *Euphytica* 78:7–18
- Raboin, LM, Pauquet J, Butterfield M, D'Hont A, Glaszmann JC (2008) Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane. *Theor Appl Genet* 116:701–714
- Rodríguez, HAM, Castillo CMA, Flores BEP (2005) Genetic Diversity of the most important sugarcane cultivars in México. e-Gnosis. Universidad de Guadalajara. 3:1665 – 5745
- Rossi, M, Araujo PG, Paulet F, Garsmeur O, Dias VM, Chen H, Van- Sluys MA, D'Hont AD (2003) Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. 269: 406–419
- Selvi, A, Nair NV, Noyer JL, Singh NK, Balasundaram N, Bansal KC, Koundal, Mohapatra T (2006) AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity in the sugarcane complex, *Saccharum* and *Erianthus*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 831–842
- Vos, P, Hogers R, Bleeker M, Reijans MV, Der LT, Hornes M (1995) AFLP a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414
- Vuylsteke, M, Mank R, Brugmans B, Stam P, Kuiper M (2000) Further characterization of AFLP data as a tool in genetic diversity assessments among maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Mol. Breeding*. 6: 265–276