

Marcadores RAPD para determinar la divergencia genética en genotipos RB de caña de azúcar

João de Andrade Dutra Filho^{1*}, Paulo Rocha Machado¹, Ismael Gaião da Costa¹, Djalma Euzébio Simões Neto¹, Leonam José da Silva¹, Andrea Chaves¹, Tercilio Calsa Junior², Reginaldo de Carvalho³

ABSTRACT

The objective this work to estimate the genetic divergence of clones and RB varieties sugarcane. Were used 11 molecular markers RAPD that detected a high degree of genetic polymorphism in the material evaluated. The total number of bands produced was 61, representing 100% of the amplified fragments. The total number of polymorphic was 58 (95.08%), while the number of monomorphic bands were three (4.92%). The RAPD markers, although they are considered markers of low reproductilidade, were effective in determining the genetic divergence between the clones and varieties that were evaluated, allowing an indication of parents to be used in studies of hybridization.

RESUMEN

RESUMO

Se objetivó con este trabajo estimar la divergencia genética en clones y variedades RB de caña de azúcar. Fueron utilizados 11 marcadores RAPD que detectaron un alto grado de polimorfismo genético. El número total de bandas producidas fue de 61, que representa el 100% de los fragmentos amplificados. El número total de bandas polimórficas fue de 58 (95,08%), mientras que el número de bandas monomórficas fueron tres (4,92%). Los marcadores moleculares RAPD, a pesar de ser considerados marcadores de baja reproductividad, se mostraron eficientes en la determinación de la divergencia genética entre los clones y las variedades que fueron evaluados permitiendo inclusive la indicación de genitores a ser utilizados en trabajos de hibridación.

^{1*}EECAC/PMGCA/UFRPE/RIDESA. DOUTORANDO PPGG/UFPE

¹EECAC/PMGCA/UFRPE/RIDESA

²DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DA UFPE

³DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA UFRPE

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es una das culturas de gran importancia socioeconómica en Brasil. Siendo utilizada como materia prima para la fabricación de diversos compuestos como azúcar, etanol, producción de energía limpia e renovable, además de contribuir en la generación de empleos. Debido a la degeneración de las variedades, que ocasiona serios declives en los rendimientos agrícolas e industriales, nuevas variedades deben ser desarrolladas para sustitución de aquellas que ya presentan el problema en cuestión (ESPIRONELO et al., 1987).

El punto de partida para la obtención de novas variedades es obtener poblaciones mejoradas en las cuales los mejoradores efectuaran la selección. Siendo así, la recombinación entre variedades comerciales y clones elites, distantes genéticamente, que ya presentan en su constitución genes relacionados a caracteres de interés es de fundamental importancia para la obtención de esas poblaciones con gran perspectiva en la recuperación de híbridos de mayor efecto heterótico en las fases de selección (MATSUOKA et al., 2005).

La aplicación de marcadores moleculares en la elaboración de los cruces, visando obtener poblaciones mejoradas viene siendo adoptada como una herramienta adicional por los programas en el mejoramiento genético de la caña de azúcar.

Los marcadores moleculares RAPD, a pesar de ser considerados marcadores de baja reproductibilidades presentan la ventaja de acceso a la divergencia genética a nivel de DNA cuando comparados a caracteres morfo-agronómicos que son fácilmente influenciados por el ambiente.

Es una técnica de bajo costo y de fácil ejecución proporcionando rapidez en la obtención de los resultados (CAIXETA et al., 2006).

En base a esas consideraciones este trabajo tiene como objetivo evaluar la divergencia genética en clones y variedades RB de caña de azúcar a través de marcadores moleculares RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tres progenies oriundas de autofecundación fueron evaluadas. La primera comprende seis genotipos obtenidos a través de la autofecundación da variedad RB867515, a segunda sete genotipos da autofecundación de la variedad RB943365 y la tercera también 7 genotipos provenientes da autofecundación de la variedad RB863129 (Tabla 1). Todos los cruzamientos fueron realizados en la Estación de Floración y Cruzamiento de Devaneio en Amaraji, Pernambuco del Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de azúcar da RIDESA (Red Interuniversitaria para el Desarrollo del Sector del azúcar y del alcohol).

Tabla 1. Identificación das tres progenies de la caña de azúcar.

PROGENIE 1.	PROGENIE 2.	PROGENIE 3.
1. RB867515*	2. RB943365*	3. RB863129*
UFRPE06-01	UFRPE06-07	UFRPE06-14
UFRPE06-02	UFRPE06-08	UFRPE06-15
UFRPE06-03	UFRPE06-09	UFRPE06-16
UFRPE06-04	UFRPE06-10	UFRPE06-17
UFRPE06-05	UFRPE06-11	UFRPE06-18
UFRPE06-06	UFRPE06-12	UFRPE06-19
	UFRPE06-13	UFRPE06-20

Note: 1. RB867517* Genitor da progenie 1

2. RB943365* Genitor da progenie 2

3. RB863129* Genitor da progenie 3

Total: 23 genotipos

Los genotipos han sido seleccionados en campo en la fase T1 caña soca del mejoramiento genético de la caña de azúcar a través de la selección de masa, de acuerdo con la metodología del PMGCA/UFRPE/RIDESA, con base en los siguientes caracteres: índice de sólidos solubles(BRIX) medidos con un refractómetro de campo, altura y diámetro de tallos medidos con el auxilio de cinta métrica y pinza, número de colmos por cepa con base en el contaje del número de colmos de cada cepa (fueron seleccionados genotipos que presentaron en lo mínimo siete tallos por cepa), caracteres morfológicos generales y resistencia las principales enfermedades y plagas que afectan la agricultura cañera en el estado de Pernambuco.

La extracción de DNA y las reacciones de amplificación seguirán el protocolo descrito por Nienhuis et al. (1995) Pereira et al. (2007) respectivamente, con modificaciones para caña de azúcar. Fueron utilizados 11 marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) de la Operon Technologies (Tabla 2).

Tabla 2. Marcadores RAPD con sus respectivas secuencias usados en el análisis molecular de genotipos de caña de azúcar.

Primeros	Secuencias
OPAL 09	TCGCTGGTGT
OPAN 20	GAGTCCTCAAC
OPAX 02	TTCCGCCACC
OPAX 09	GGTCTGGTTG
OPAX 10	CCCTAGACTG
OPAX 11	GGAGCCTCAG
OPAX 12	TCGCCAGCCA
OPAX 16	CTCTGTTCGG
OPAX 17	GACACGGACC

OPAX 18	GACTAGGTGG
OPAX 19	TGGCAAGGCA

Para los marcadores RAPD, las reacciones de amplificación tuvieron volumen final de 12,01 µl, contenidos: 5,45 µl de agua, 2,25 µl de DNA (10 ng.ml⁻¹), 0,66 µl de dNTP (contenido: 50µM de cada uno de los desoxiribonucleotídeos trifosfatos dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,25 µl de oligonucleótido iniciador (0,4 µM), 1,0 µl de tampón de reacción (50mM de Tris pH 8,0; 2,0mM de MgCl₂; 20mM de KCl; 250µg.mL⁻¹ de albumina de soro bovino; 1% de ficoll 400 e 1mM de tartrazine) e 0,4 unidades de la enzima Taq polimerasa.

Las reacciones fueron amplificadas en termociclador Eppendorf MasterCycler Gradiente 5331. La amplificación fue seguida por 40 ciclos, cada uno a 94 ° C por dos minutos, 37 ° C por 15 segundos y 72 ° C por 1 min, con una extensión final a 72 ° C por dos minutos.

La separación de los productos amplificados fue realizada en electroforesis horizontal a 50 volts, durante 6 horas con gel de agarosa ultra pura a 1% inmerso en tampón TBE (0,45 M de tris-borato, 0,01 M de EDTA pH 8,0).

Pasado este tiempo los geles fueron tratados con solución de brometo de etidio a 0,5µg.ml⁻¹ por veinte minutos, visualizados en transiluminador de luz ultravioleta y fotografiada en cámara fotográfica EDA – 290, de Kodak.

Los marcadores moleculares fueron analizados en cuanto a la presencia (1) o ausencia (0) de bandas. Las estimativas de la divergencia genética entre los genotipos fueron obtenidas por medio del complemento aritmético del coeficiente de Jaccard y para construir el dendrograma se utilizó el método jerárquico del tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetical Averages), desarrollado por Sokal y Michener (1958). Para verificar la concordancia entre los valores originales de disimilaridad y aquellos representados en el dendrograma se efectuó el cálculo del coeficiente de correlación fenético segundo Sokal y Rohlf (1962). El número óptimo de bandas fue analizado por el método bootstrap (Manly, 1997). Los análisis genético-estadísticos fueron realizadas con el auxilio del programa Genes (CRUZ, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los marcadores RAPD utilizados en el presente estudio generaron un alto grado de polimorfismo genético en los genotipos evaluados. El número total de bandas producidas fue de 61, que representa 100% de los fragmentos amplificados (Tabla 3). El número total de bandas polimórficas fue de 58 (95,08%), mientras que el número de bandas monomórficas fueron tres (4,92%).

Tabla 3. Detección de polimorfismo genético en progenies de caña de azúcar obtenido a través de la utilización de 11 marcadores RAPD.

Primers	Total amplified fragments	Monomorphic	(%)	Polymorphic	(%)
---------	---------------------------	-------------	-----	-------------	-----

		fragmentos		fragmentos	
OPAL 09	5	0	0	5	100
OPAN 20	5	0	0	5	100
OPAX 02	1	0	0	1	100
OPAX 09	5	1	20	4	80
OPAX 10	4	1	25	3	75
OPAX 11	5	0	0	5	100
OPAX 12	8	0	0	8	100
OPAX 16	7	0	0	7	100
OPAX 17	6	0	0	6	100
OPAX 18	6	1	16.66	5	83.34
OPAX 19	9	0	0	9	100
Total	61	3	4.92	58	95.08

El primer OPAX19 generó el mayor número de fragmentos (nueve), todos ellos polimórficos (100%). Los primeros OPAX12, OPAX16, OPAX17, OPAX11, OPAN20, OPAL09 y OPAX02 también presentaron 100% de polimorfismo, con un total de 8, 7, 6, 5, 5, 5 e 1, bandas respectivamente. Siendo considerados, por lo tanto, los marcadores más polimórficos.

Los primeros OPAX18, OPAX09, OPAX10 presentaron un nivel satisfactorio de polimorfismo genético. OPAX18 amplificaron seis bandas, 5 polimórficas y 1 mono mórfica (83.34% polimorfismo), OPAX09 amplificaron 5 bandas, 4 polimórficas y 1 mono mórfica (80% polimorfismo) y OPAX10 con 4 bandas amplificadas 3 polimórficas y 1 mono mórfica (75% polimorfismo).

El nivel de polimorfismo detectado por los marcadores RAPD, estuvo de acuerdo con aquel obtenido por Almeida et al. (2009), que caracterizaron 14 variedades comerciales de caña de azúcar por medio de marcadores ISSR y detectaron 95% de polimorfismo genético. Considerando que los marcadores ISSR son más polimórficos que RAPDs, por el hecho de ser marcadores semi-arbitrarios basados en repeticiones micros satélites, segundo Souza et al. (2005), Ley et al. (2006), se puede afirmar que los primeros RAPD fueron eficientes para detectar variabilidad genética en los genotipos evaluados en este trabajo.

El coeficiente de correlación cofenético entre la matriz de disimilaridad obtenida pelo complemento aritmético del coeficiente de Jaccard y la matriz cofenética fue de $r = 0,91$. Para Cruz y Carneiro (2006), cuanto mayor el valor del coeficiente de correlación cofenético, menor será la distorsión provocada al agrupar los genotipos. Lapoint y Legendre (1992), afirman que el mejor ajuste se encienta cuando el valor de r es superior a 0,9. Siendo así, se puede constatar que, en el presente trabajo, la concordancia entre los valores originales de disimilaridad y aquellos representados en el dendrograma presentan excelente precisión.

Los análisis de bootstrap están presentados en la figura 1. Se constata, una relación inversamente proporcional entre el número de bandas que fueron analizadas y el valor de stress, teniendo alta consistencia a partir de 60 bandas en donde el valor de la correlación fue de 0,99 y del

stress 0,030. Colombo et al. (2000), afirman que el intervalo entre 50 y 100 bandas es considerado adecuado para estudiar las relaciones genéticas en las especies vegetales..

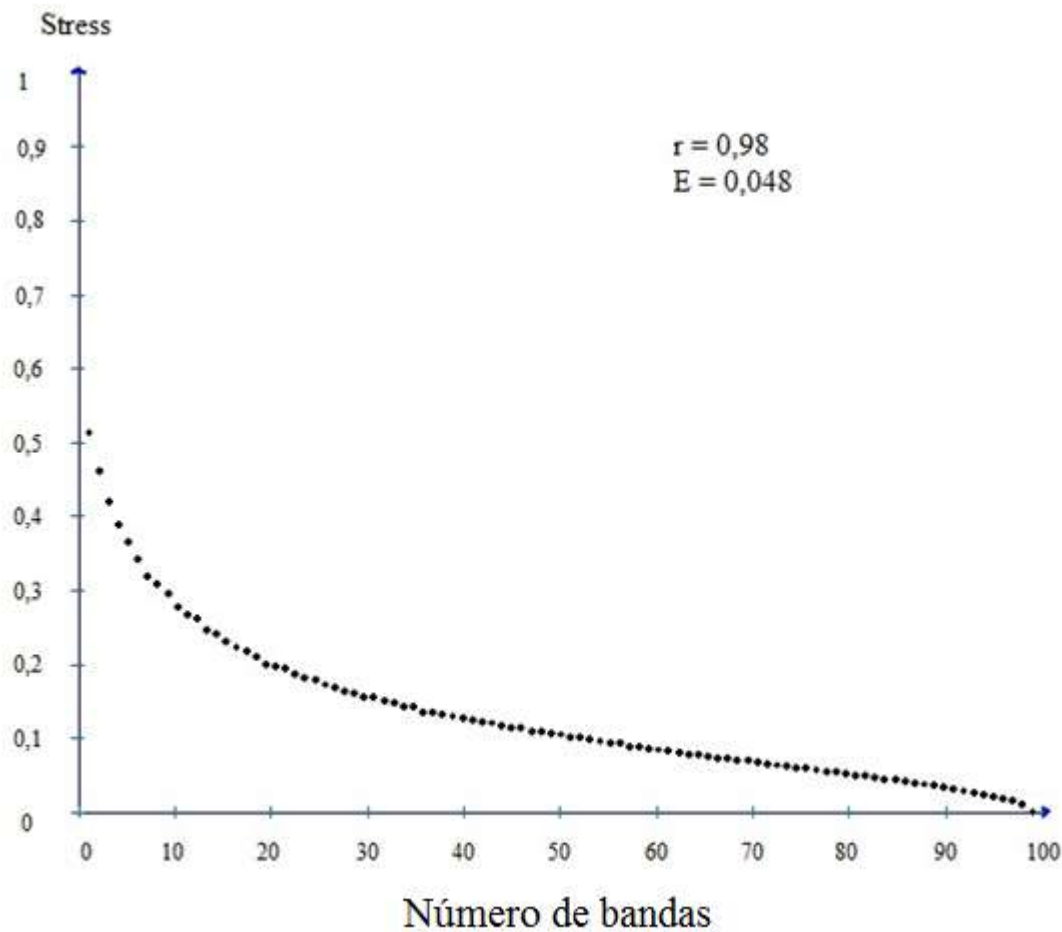


Figura 1. Estimativa del número óptimo de bandas, obtenidas por el análisis de bootstrap, para representar la divergencia genética en clones y variedades comerciales de caña de azúcar a partir de informaciones binarias generadas por marcadores moleculares micros satélites.

El dendrograma de disimilaridad generado por el método UPGMA y basado en la información obtenida a través de la utilización de marcadores RAPD, ha permitido la formación de 2 grandes grupos (Figura 2). Sin embargo, con base en el punto de corte correspondiente la disimilaridad genética de aproximadamente 75%, pode-se constatar la formación de IV grupos. El grupo I incluye los genotipos UFRPE06-03, UFRPE06-06,UFRPE06-02, UFRPE0601, UFRPE06-05, UFRPE06-04, RB943365, UFRPE06-07, RB863129, UFRPE06-14, UFRPE06-16, UFRPE06-11, UFRPE06-15, UFRPE06-12, UFRPE06-13 y RB867515. El grupo II los genotipos UFRPE06-17, y UFRPE06-18. El grupo III los genotipos UFRPE06-19 y UFRPE06-20 y finalmente el grupo IV los genotipos UFRPE06-09 y UFRPE06-10.

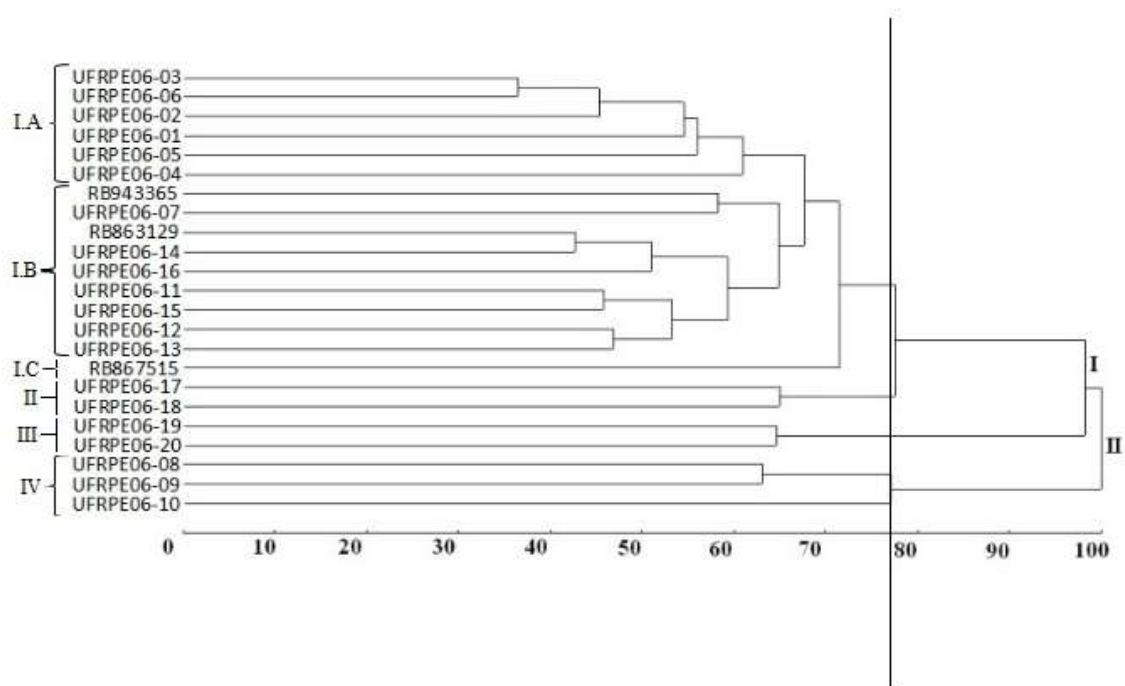


Figura 2. Dendrograma representativo del patrón de disimilaridad, establecido por el método jerárquico de la ligación promedio entre grupo, con base en la utilización conjunta de marcadores moleculares del tipo RAPD. El valor del coeficiente de correlación cofenético (r) es de 0,91.

CONCLUSIÓN

1. Los marcadores moleculares RAPD se mostraron eficientes en la determinación da divergencia genética en caña de azúcar.
2. Aplicando os resultados obtenidos al mejoramiento vegetal, el fitomejorador debe direccionar sus esfuerzos para promover hibridaciones entre los genotipos 12 x 22, 12 x 14, 12 x 7, 12 x 6, 12 x 4, 12 x 3 e 12 x 2 a fin de obtener nuevos individuos que reúnan en su constitución genética mayor número de alelos relacionados a caracteres de interés a la agroindustria cañera

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.M.A.; LIMA, S.E.M.; LIMA, G.S.A.; BRITO, J.Z.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M.V. (2009). Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. *Ciência e agrotecnologia*. v. 33, p. 1771-1776.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S (2006). Tipos de Marcadores moleculares. In: **Marcadores Moleculares** (CAIXETA, E.T.; BORÉM, A. eds.). Editora: UFV, Viçosa. Brasil. p. 9-78.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A (2000). Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. v. 23, n. 1, p. 189-199.

CRUZ, C.D (2006). **Programa Genes: Biometria**. Editora: UFV, Viçosa, 382p.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S (2006). **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Editora: UFV, Viçosa. 585p.

LAPOINTE, F.J.; LEGENDRE, P (2006). Statistical significance of the matrix correlation coefficient for comparing independent phylogenetic trees. *Systematic Biology*. v. 41, n. 3, p. 378-384.

LEI, Y.; GAO, H.; TSERING, T.; SHI, S.; ZHONG, Y (2006). Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats. *Genetics and Molecular Biology* v. 29, n. 2, p. 339-344.

MANLY, B.F. J (1997). **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology**. Chapman & Hall, London, 388p.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J.B (1995). Genetic relations among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD marker. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. v. 120, p. 300-306.

PEREIRA, H.S.; SANTOS, J.B.; ABREU, A.F.B.; COUTO, K.R (2007). Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v. 42, n. 5, p. 707-713.

SOKAL, R.R.; MICHENER, D.A (1958). A statistical method for evaluation systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* v. 38, p. 1409-1438.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J (1962). The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxonomy*. v. 11, n. 2, p. 30-40.

SOUZA, V.C.; PEREIRA, A.S.; KOPP, M.M.; COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; DA LUZ, V.K.; OLIVEIRA, A.C (2005). Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. *Bragantia*. v. 64, n. 4, p. 569-575.