

Avances en la Caracterización Molecular y Anatómica de Caña de Azúcar

Javier Fco. Alfaro-Porras¹, Oscar J. Rocha N.², Luis Gómez-Alpizar³, Walter Marín⁴,

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) ha sido esencial para el éxito que este cultivo tiene en las zonas en donde se siembra (Chaves *et al.* 2004). Muchos de los problemas que presenta sólo pueden ser superados sosteniblemente mediante mejoras en los materiales genéticos. En este caso, el cambio constante que se da en el campo de las variedades responde a varios factores, entre los que están rendimientos agroindustriales y enfermedades, principalmente. Para esto es necesario, no sólo la expresión final (en términos de rendimiento o resistencia a una enfermedad) sino también conocer la estrategia que la planta utiliza para adaptarse a las nuevas condiciones impuestas por el hombre en el proceso de domesticación, para aumentar su productividad. Este conocimiento daría una mayor información en la selección de materiales para programas de mejoramiento. Es importante promover la integración de información proveniente de disciplinas como la anatomía, morfología y fisiología en los esfuerzos de fitomejoramiento, junto con la tradicionalmente obtenida de caracteres agronómicos e industriales (Artschwager 1940; Moore 1987).

¹ Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar, Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar
Email: jfalfaroporras@yahoo.com jalfaro@laica.co.cr

² Biological Sciences Department, Kent State University
Email: orocha@kent.edu

³ Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica
Email: luis.gomezalpizar@ucr.ac.cr

⁴ Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica
Email: walter.marin@ucr.ac.cr

Debido a la importancia que tienen la acumulación y transporte de azúcares y agua, y a la conocida vulnerabilidad de algunos materiales a enfermedades bacterianas, como el raquitismo del retoño (*Leifsonia xyli* subsp *xyli*) (Subirós 1998), así como a algunos herbicidas (Bolaños 2006, conv. pers.), la variabilidad que muestran distintos materiales a estas características (Subirós, 1998) debe conservarse y estudiarse con detenimiento. En este sentido, el estudio debe comprender tantos caracteres y herramientas como sea posible abarcar, según las limitaciones de cada caso, de tal forma que se pueda catalogar lo más detalladamente dicha variabilidad. En estos casos, la búsqueda y utilización de descriptores morfológicos confiables y fáciles de usar son imprescindibles.

Se han realizado varios trabajos en esta línea, en el último siglo, tales como los de Artschwager (1925, 1940), Gallacher (1994, 1997a,1997b), y Gallacher y Berding (1997). Artschwager (1930) realizó extensos trabajos en anatomía de caña de azúcar, con particular énfasis en descriptores; uno de los más interesantes lo realizó en patrones celulares epidérmicos.

Las herramientas moleculares se han utilizado exitosamente para valorar genéticamente los rasgos de la caña de azúcar, entre muchas razones por la complejidad del grupo *Saccharum*, particularmente por el grado de poliploidía y la gran cantidad de híbridos interespecíficos (Berding *et al.et al.*2004). A nivel de diversidad se han utilizado distintos sistemas moleculares (Cordeiro *et al.et al.*2003), sin embargo, la herramienta más versátil para su utilización en la identificación de clones entre otras razones por su fortaleza para discernir entre materiales cercanamente relacionados han sido los microsatélites (Cordeiro *et al.et al.*2003, Aljanabi *et al.et al.*2001).

En Costa Rica, el mejoramiento genético de la caña de azúcar se ha realizado a través de cruces entre un número relativamente reducido de clones, durante las dos últimas dos décadas

(Durán y Oviedo 2006), lo que puede conllevar un estrechamiento de la base genética utilizada para los clones LAICA. La introgresión con materiales silvestres o menos domesticados, como *S. spontaneum* o *S. sinense*, podrían aportar variabilidad importante, si los materiales nacionales se comportan como lo reportado por Cordeiro *et al.* (2003).

Por lo tanto es necesario un estudio de este tipo para corroborar la existencia de diferencias anatómicas a nivel de tejidos de almacenamiento y vasculares, principalmente, y relacionarlas con las diferencias genéticas de cada material y a otras variables como contenido de fibra y composición de los jugos (que son de interés primordial para la parte industrial del sector).

En el cultivo de la caña, una de las mejores defensas se da en la línea genética, mediante nuevas variedades y probablemente la mejor forma de mantenerse en esa ruta es caracterizando, de la forma más minuciosa posible, los materiales que se liberen y se utilicen para generar los nuevos clones. El desarrollo de protocolos adecuados de caracterización e identificación de materiales *Saccharum* spp. contribuiría enormemente a hacer una mejor prospección de dichos materiales y abriría las puertas, para iniciar una línea de investigación que promete y que se encuentra rezagada.

Esta investigación se lleva a cabo con el fin de caracterizar clones de caña de azúcar de la serie LAICA mediante marcadores moleculares, anatómicos y morfológicos. Para esto se ha abordado la misma desde cuatro áreas, a saber: estandarizar e implementar la técnica de microsatélites a las condiciones nacionales con los clones de la serie LAICA, estandarizar e implementar un juego de marcadores anatómicos y morfológicos complementario y/o alternativo a técnicas moleculares, validar los marcadores anatómicos y morfológicos con los resultados obtenidos de

los marcadores moleculares e implementar los resultados en un protocolo de identificación de clones de la serie LAICA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un banco de germoplasma, ubicado en la Estación Experimental de la Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar en Santa Gertrudis Sur de Grecia, Alajuela (DIECA). Este banco contenía 78 variedades de caña de azúcar *Saccharum* sp. Hybr.(Cuadro 1). Además, se utilizaron una colección de 32 individuos de *Saccharum spontaneum* (Cuadro 2) procedentes de la Zonas Sur y la Zona Atlántica de Costa Rica.

La utilización del banco de germoplasma permitió tener el material centralizado en un lugar relativamente cercano en donde se realizaron las extracciones y primeros análisis y evitar las posibles variaciones ambientales que puedan influir en los resultados anatómicos y morfológicos.

El terreno en que se encontraba el material bajo estudio fue previamente preparado con prácticas de manejo y preparación de suelos. Se demarcaron parcelas de 2 m de longitud por 1.5 m de separación entre surcos. En cada parcela se sembró una sola variedad, por esquejes de tres yemas, a una densidad de 12 yemas por metro lineal, en dos hileras de esqueje (8 esquejes o 24 yemas por parcela) (Cuadro 1).

Las variedades corresponden a: i) clones de la serie LAICA mejorados en el país en etapas de evaluación (con pequeñas áreas de siembra); ii) materiales que han sido o son actualmente de interés comercial (por lo tanto sembradas en áreas extensas); iii) progenitores de los anteriores que pueden estar representados tan sólo por parcelas en el Banco de Germoplasma de LAICA en la Estación Enrique Jiménez Núñez, en Cañas, Guanacaste, Costa Rica, o en otro banco de germoplasma; iv) clones que se tiene alguna certeza sean una especie diferente

La colección de *S. spontaneum* consistía originalmente de 32 individuos, que se mantuvieron en cuarentena en un invernadero en la Estación Experimental de DIECA en Santa Gertrudis Sur de Grecia, Alajuela, desde diciembre de 2006 a julio de 2008. Cada individuo (accesión) fue sembrado en potes plásticos de 30 cm de diámetro por 40 cm de altura (Cuadro 2).

Se colectaron las láminas de la hoja +3 de 5 tallos al azar de las 78 variedades y de 24 accesiones de cada parcela para obtener el material vegetal y se mantuvieron a temperatura ambiente con sílica gel hasta las extracciones de ADN para el análisis molecular. Las muestras

Posteriormente se colocaron en tubos de 50 mL donde fueron deshidratadas previa congelación a -80°C por 3 días, después fueron liofilizadas por 4 días para muestras frescas o 2 días para muestras previamente secas con sílica gel.

La maceración del material vegetal se hizo agregando 3-6 esferas de acero de 6 mm de diámetro y agitándolo en un vórtex a máxima velocidad por 2 minutos o hasta obtener una textura suficientemente fina.

La extracción de ADN se realizó según el procedimiento descrito por Mc Couch *et al.* (1988) a partir de hoja y para determinar si la extracción de ADN fue exitosa en cuanto a la cantidad y la calidad, se visualizaron las muestras en geles de agarosa al 1%. En estos mismos geles se hizo una cuantificación aproximada utilizando el Mass Ruler de Fermentas.

Las muestras de ADN se diluyeron en amortiguador TE hasta obtener concentraciones de 1 ng/uL, de acuerdo con las concentraciones obtenidas en el paso anterior.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 10 uL (Cuadro 3) conteniendo 1 ng de ADN, 0.7 μM de cada imprimador, 1X de amortiguador para PCR, 0.25 mM de dNTPs, 1.0 Ud. de *Taq*, 1.5 mM de cloruro de magnesio y agua. La amplificación final fue realizada en un termociclador marca MJ Research PTC-200 con un paso inicial de

desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido por 39 ciclos de 45 segundos a 94°C de desnaturalización, 30 segundos a 47.7-64.0°C para alineamiento de acuerdo con el imprimador, extensión a 72°C por 30 segundos y un ciclo final a 72°C por 10 minutos. Se hicieron geles de agarosa al 5% para estandarizar los protocolos y verificar polimorfismos (Fig. 1).

La caracterización molecular se realizó mediante la técnica de microsatélites (Powell *et al.*1996) utilizando 15 primers o imprimadores para microsatélites (Brown *et al.*2007) desarrollados para *Saccharum* spp. (Cuadro 3). El producto de PCR fue separado por electroforesis en geles de agarosa para verificar la amplificación. Una vez obtenidos productos de amplificación de PCR fueron mezclados en multiplexes y valorados en un secuenciador Beckman-Coulter CEQ 8800 por presencia o ausencia de cada producto identificado para cada marcador en cada uno de los materiales (Brown *et al.*2007)

Para cada uno de los imprimadores se hicieron gradientes de temperatura de alineamiento para corroborar que las temperaturas reportadas por los fabricantes fueran las adecuadas, pues no había reporte en la literatura para cada imprimador (Fig. 2).

Se tuvo que estandarizar de nuevo la reacción de amplificación de ADN, a estas condiciones descritas anteriormente, pues la reacción original ensayada en los laboratorios de Biotecnología Vegetal del CIA, no estaba amplificando en las condiciones del laboratorio en Biological Sciences Department en Kent State University.

Cuadro 1. Variedades de *Saccharum* spp Hyb. presentes en el Banco de Germoplasma a utilizar como fuente de material vegetal.

Variedad	Progenitor		Región	Parcela	Procedencia	Uso del material
	Masculino	femenino				
H 61-1721	H 49-3533	?	VCOR	2	Juan Viñas	Variedad Comercial
H 62-4671			VCOR	3	Juan Viñas	Variedad Comercial
H 68-1158			VCOR	4	Juan Viñas	Progenitor
H 74-1715			VCOR	5	Juan Viñas	Variedad Comercial
H 77-2545	H 62-2209	?	VCOR	6	Juan Viñas	Control Regional
H 77-4643	H 60-38-62	?	VCOR	7	Juan Viñas	Control Regional
H 78-2313			VCOR	8	Juan Viñas	Variedad Comercial
LAICA 01-272	H 68-1158	?	VCOR	9	Juan Viñas	Clon promisorio
LAICA 04-220	RD 75-11	LAICA 92-14	VCOR	10	Juan Viñas	Clon promisorio
LAICA 04-225	RD 75-11	LAICA 92-14	VCOR	11	Juan Viñas	Clon promisorio
LAICA 02-207	B 76-259	SP 70-1143	VCOR	12	Turrialba	Clon promisorio
LAICA 03-204	Q 96	SP 70-1143	VCOR	13	Turrialba	Clon promisorio
LAICA 03-208	Q 96	SP 70-1143	VCOR	14	Turrialba	Clon promisorio
LAICA 03-215	Q 96	SP 70-1143	VCOR	15	Turrialba	Clon promisorio
LAICA 98-202	B 76-259	?	VCOR	16	Turrialba	Clon promisorio
LAICA 98-211	B 76-259	?	VCOR	17	Turrialba	Clon promisorio
LAICA 98-215	B 76-259	?	VCOR	18	Turrialba	Clon promisorio
PINDAR	Co 270	MQ 33-157	VCOR	19	Turrialba	Control Regional
LAICA 03-805	Q 96	SP 70-1143	RS	20	Pérez Zeledón	Clon promisorio
LAICA 04-805	RD 75-11	B 60-267	RS	21	Pérez Zeledón	Clon promisorio
LAICA 04-809	RD 75-11	B 60-267	RS	22	Pérez Zeledón	Clon promisorio
LAICA 04-810	RD 75-11	B 60-267	RS	23	Pérez Zeledón	Clon promisorio
SP 71-5574	CB 46-260	CP 65-588	RS	24	Pérez Zeledón	Progenitor, Variedad Comercial
LAICA 01-601	Q 96	SP 70-1143	RN	25	San Carlos	Clon promisorio
LAICA 01-604	Q 96	SP 70-1143	RN	26	San Carlos	Clon promisorio
LAICA 87-601	R 570	?	RN	27	San Carlos	Clon promisorio
SABORIANA			RN	28	San Carlos	Variedad Comercial
LAICA 04-310	SP 79-2233	?	PS	29	CATSA El Moral	Clon promisorio
B 74-132			PS	30	EEJN	Variedad Comercial
B 79-360			PS	31	EEJN	Control Regional, Progenitor, Variedad Comercial
B 80-689	B 76-78	?	PS	32	EEJN	Control Regional, Variedad Comercial
B 82-333			PS	33	EEJN	Variedad Comercial
BJ 82-119			PS	34	EEJN	Variedad Comercial
CP 72-1210	CP 65-357	CP 56-63	PS	35	EEJN	Variedad Comercial
CP 72-2086	CP 62-374	CP 63-588	PS	36	EEJN	Variedad Comercial
CP 80-1743			PS	37	EEJN	Variedad Comercial
CP 87-1248			PS	38	EEJN	Variedad Comercial
LAICA 00-301	CTC 93-811	?	PS	39	La Argentina	Clon promisorio
LAICA 00-303	CTC 93-858	?	PS	40	EEJN	Clon promisorio
LAICA 00-307	CTC 93-822	?	PS	41	La Argentina	Clon promisorio
NA 56-42			PS	42	EEJN	Control Regional

Cuadro 1. Variedades de *Saccharum* spp Hyb presentes en el Banco de Germoplasma a utilizar como fuente de material vegetal (continuación).

Variedad	Progenitor		Región	Parcela	Procedencia	Uso del material
	Masculino	femenino				
NCo 310	Co 421	Co 312	PS	43	EEJN	Variedad Comercial
NCo 376	Co 421	Co 312	PS	44	EEJN	Variedad Comercial
Q 96	Q 63	Q 68	PS	45	EEJN	Progenitor, Variedad Comercial
SP 70-1143			PS	46	EEJN	Progenitor, Variedad Comercial
SP 70-1284	CB 41-76	?	PS	47	EEJN	Variedad Comercial
SP 79-2233	H 56-2954	?	PS	48	EEJN	Progenitor, Variedad Comercial
SP 81-2068			PS	49	EEJN	Variedad Comercial
SP 81-3250			PS	50	EEJN	Variedad Comercial
LAICA 01-615	PINDAR	SP 70-1143	RN	51	San Carlos	Clon promisorio
Q 132			RN	52	San Carlos	Variedad Comercial
Q 135			RN	53	EEJN	Variedad Comercial
Q 135			RN	54	San Carlos	Variedad Comercial
Q 138			RN	55	EEJN	Variedad Comercial
B 47-44			VCOC	56	DIECA	Progenitor
LAICA 01-015	RD 75-11	SP 71-5574	VCOC	57	DIECA	Clon promisorio
LAICA 01-020	Q 96	SP 70-1143	VCOC	58	DIECA	Clon promisorio
LAICA 01-027	RD 75-11	SP 71-5574	VCOC	59	DIECA	Clon promisorio
LAICA 01-037	POJ 2878	?	VCOC	60	DIECA	Clon promisorio
LAICA 92-14	H 53-3989	?	VCOC	61	EEJN	Progenitor
MEX 57-473	CB 40-77	CP 43-47	VCOC	62	EEJN	Control Regional
MEX 79-431	Co 421	MEX 57-473	VCOC	63	DIECA	Control Regional
RB 72-1012			VCOC	64	EEJN	Variedad Comercial
RB 73-9735	B 52-179	?	VCOC	65	EEJN	Variedad Comercial
RD 75-10			VCOC	66	EEJN	Variedad Comercial
RD 75-11	CB 38-22	CP 57-603	VCOC	67	EEJN	Progenitor, Variedad Comercial
SP 82-1176			VCOC	68	EEJN	Variedad Comercial
B 76-259			VCOR	69	EEJN	Progenitor, Variedad Comercial
B 77-95			VCOR	70	EEJN	Control Regional, Progenitor, Variedad Comercial
LAICA 01-213	RD 75-11	SP 71-5574	VCOR	71	Turrialba	Clon promisorio
LAICA 02-202	B 76-259	SP 70-1143	VCOR	72	Turrialba	Clon promisorio
POJ 2878	POJ 2394	E.K. 28	VCOR	73	EEJN	Progenitor
B 60-267				74	EEJN	Progenitor
B 76-385				75	EEJN	Variedad Comercial
CR 61-01				76	EEJN	Variedad Comercial
TCP 87-3388				77	EEJN	Clon promisorio
TCP 93-4245				78	EEJN	Clon promisorio
Japonesa	<i>S. officinarum</i>	<i>S. spontaneum</i>		79	DIECA	Acesión del Banco de Germoplasma

Abreviaturas: VCOR, Valle Central Oriental; RS, Región Sur; RN, Región Norte; PS, Pacífico Seco; VCOC, Valle Central Occidental; EEJN, Estación Enrique Jiménez Núñez, Cañas, Guanacaste; DIECA, Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar.

Cuadro 2. Datos de ubicación de las plantas de *Saccharum spontaneum* en Río Claro, Zona Sur y El Carmen de Siquirres Zona Atlántica, Costa Rica.

Pote	Población	Latitud			Longitud		
		°	'	"	°	'	"
1	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	32
2	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	32
3	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	32
4	Río Claro, Zona Sur	8	40	32	83	4	32
5	Río Claro, Zona Sur	8	40	32	83	4	32
6	Río Claro, Zona Sur	8	40	32	83	4	32
7	Río Claro, Zona Sur	8	40	32	83	4	32
8	Río Claro, Zona Sur	8	40	32	83	4	32
9	Río Claro, Zona Sur	8	40	42	83	4	31
10	Río Claro, Zona Sur	8	40	42	83	4	33
11	Río Claro, Zona Sur	8	40	40	83	4	34
12	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	32
13	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	32
14	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	32
15	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	34
16	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	33
17	Río Claro, Zona Sur	8	40	41	83	4	33
18	Cruce San Alberto, Siquirres	10	8	17	83	30	19
19	Cruce San Alberto, Siquirres	10	8	16	83	30	20
20	Cruce San Alberto, Siquirres	10	8	16	83	30	21
21	Cruce San Alberto, Siquirres	10	8	15	83	30	21
22	Cruce San Alberto, Siquirres	10	8	15	83	30	22
23	Cruce San Alberto, Siquirres	10	8	16	83	30	22
24	Cruce San Alberto, Siquirres	10	8	15	83	30	15
25	El Cocal, Siquirres	10	7	38	83	30	35
26	El Cocal, Siquirres	10	7	37	83	30	34
27	El Cocal, Siquirres	10	7	37	83	30	34
28	El Cocal, Siquirres	10	7	36	83	30	34
29	El Cocal, Siquirres	10	7	39	83	30	36
30	El Cocal, Siquirres	10	7	39	83	30	36
31	El Cocal, Siquirres	10	7	38	83	30	33
32	El Cocal, Siquirres	10	7	37	83	30	33

Finalmente se logró una amplificación aceptable mediante la reacción original utilizada por Brown et al 2007, modificándole la concentración de cloruro de magnesio, como se observa a continuación en el Cuadro 4.

74B 71A 67A 46D 8(1:1) 4A
71B 67B 51A 46B 8(1:10) M

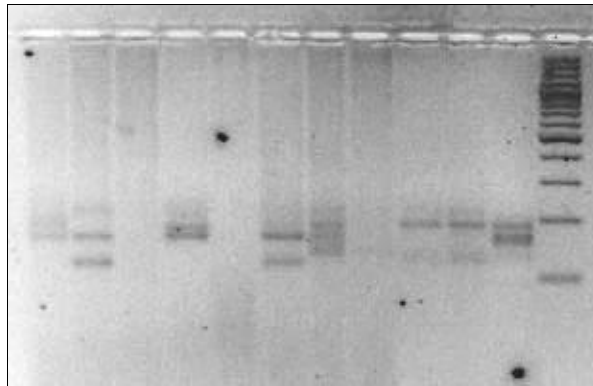


Figura 1. Gel de Agarosa al 5%. 270308.

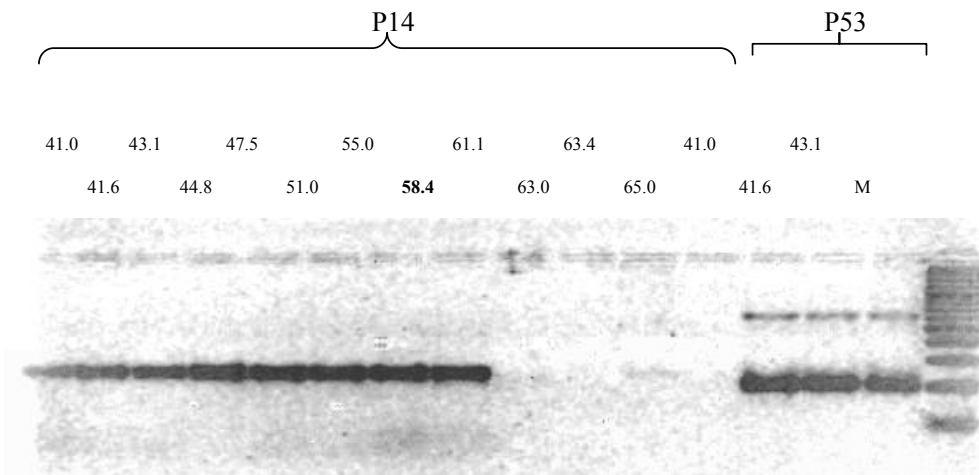


Figura 2. Gel de Agarosa al 5%. Primers 14 y 53, ADN: $2 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$. 310508

Se hicieron aproximadamente 2700 PCR con lo que se cubrieron las 3 replicas de las 78 variedades y las 24 muestras de *S. spontaneum* en 10 de los 15 imprimadores propuestos inicialmente. De los 5 restantes, 4 serán evaluados próximamente y el otro no se evaluará por ahora debido a problemas de amplificación.

Cuadro 3.
Imprimadores a utilizados en la caracterización molecular de *Saccharum* spp.
(Modificado de Brown *et al.*2007).

Marcador SSR	Número de Accesoión del EMBL	Secuencia del imprimador Forward	Secuencia del imprimador Reverse	Concentración del imprimador (μ M)	Temperatura de alineamiento ($^{\circ}$ C)
mSSCIR14	AJ293486	GAT TGT TTT TCC CCC ACT A	CAC CTT GTT CTT GCT TTA CTC	0.2	53.5
mSSCIR53	AJ401330	TGG TCT ACT GAA GTT CGT G	TGC TTC TAA GTC AAC CAA A	0.2	51.0
mSSCIR54	AJ401331	CGA AGG ACC AGT TGA AAG	GGG TAA TGG AAC AGG ACA	0.2	53.3
mSSCIR67	AJ401344	GAC TGA GTA TTG GCT TGG	GCT TCT TCT TTG GTC GTT	2.0	51.2
mSSCIR70	AJ401347	ATT GGA TTC CTT CTG CTA	AGG TTT CAG TAT ATT TAT TCC	0.2	47.7
SMC334BS	NA	CAA TTC TGA CCG TGC AAA GAT	CGA TGA GCT TGA TTG CGA ATG	0.2	60.8
SMC336BS*	NA	ATT CTA GTG CCA ATC CAT CTC A	CAT GCC AAC TTC CAA ACA GAC	0.2	58.3
SMC597CS	NA	GCA CAC CAC TCG AAT AAC GGA T	AGT ATA TCG TCC CTG GCA TTC A	0.2	60.6
SMC1493CL	NA	CGA TGA GTA AAT GGG CAG C	GAT ATA GAG GAA GGG ATT GAA GG	2.0	56.9
SMC1572CL	NA	GAG GAT ATG GTT TTC ATT GCC	ACA CCT TCT CAC CAC TTA GGT TC	0.2	57.1
SMC17CG	NA	AAG GTA GCA CGA AAC ACG TCG AT CAT GCC AAC TTC	AAC CCC AGC GGC GAT CTC T GGT GAT GCG AAG	0.2	64.0
SMC221MS	NA	CAA ACA GAC T	AGA TTG GA	0.2	60.1
SMC432MS	NA	GCA AGG TTC CAV TGC AGC CTG C	TGC ATC TCC AAG AGA TTG GA	2.0	63.6
SMC869CG	NA	CTT GTT GTT TAT TAG GGT TCG TCT G	TGA GCG TTG TGC TTT CAT TT	2.0	58.4
Z355_1	NA	TTT TGC TGC TCT GTT AGA TAG CC	TCG TTG TCG TAG CAG ATG GA	0.2	59.0

Secuencia aparece en GeneBank como mSSCIR1 (accesión: AJ401273.1)

Cuadro 4.
Composición de la mezcla de reacción de amplificación (PCR).

Conc Inicial		Conc Final		1 Rx Vol (uL)	Componente
Unit		unit			# Rx
5,00	X	1,00	X	2,00	PCR Buffer Green Go
25,00	μM	1,50	μM	0,60	Taq
2,50	μM	0,25	μM	1,00	MgCl ₂
4,00	μM	0,70	μM	1,75	dNTPs
25,00	μM	0,70	μM	0,28	Primer Forward
					Primer Reverse
					Taq polimerasa
5,00	unit/ μL	0,10	unit/ μL	0,20	Fermentas
20,00	mg/mL	1,00	mg/mL	0,50	BSA
				2,00	ADN
				1,67	ddH ₂ O
				10,00	Volumen Total

Cuadro 5.
Múltiplex de productos de PCR genotipados.

Marcador	Fluorocromo	Múltiplex
Z355-1	D3	1
SMC1493CL	D3	1
SMC597CS	D4	1
mSSCIR14	D3	2
SMC17CG	D3	2
SMC334BS	D4	2
SMC1572CL	D3	4
mSSCIR54	D4	4
SMC869CG	D4	7
mSSCIR70	D3	7

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Para la caracterización morfológica y anatómica se colectarán 5 tallos al azar en cada una de las secciones dentro de las parcelas en el banco de germoplasma (Balakrishnan *et al.*2000). A cada uno de los 5 tallos se medirán las variables consideradas en el Cuadro 6, que constituyen una

modificación de lo propuesto por Gallacher (1997) para los caracteres vegetativos. Se medirá la proporción de sólidos solubles en jugo (en unidades Brix) en el entrenudo +10 y el peso de cada uno de los tallos utilizados en la caracterización morfológica.

Cuadro 6.
Descriptores morfológicos a utilizar en la caracterización morfológica de
Saccharum spp. Hyb.

Descriptor	Unidades	Sigla
Largo de la lámina	mm	LL
Ancho de la lámina	mm	AL
Largo de tallo	mm	LT
Número de entrenudos totales	unidades	NE
Número de nudos defoliados	unidades	NND
Largo de la vaina TVD (top visible dewlap)	mm	LV
Diámetro del entrenudo +10	mm	DE
Largo interno del entrenudo	mm	LED
Largo externo del entrenudo	mm	LET
Peso del tallo	g	PT
Porcentaje de sólidos disueltos (Brix)	%	BRX

Los datos de PCR fueron tabulados de forma binaria como presencia (1) y ausencia (0), mientras que los datos morfológicos fueron tabulados de forma habitual (todos en mm excepto los conteos de nudos). Coeficientes de similaridad de Gower fueron calculados para todas las combinaciones posibles de clones y accesiones con el paquete *cluster*, por el método *daisy* de R (R Development Core Team 2009). La matriz de distancias resultante fue entonces analizada por análisis de componentes principales con el paquete *princomp* y análisis de conglomerados usando el método *average* del paquete *hclust* de R (R Development Core Team 2009). Los resultados fueron dibujados mediante los paquetes *scatterplot3d* y *ygraphics* de R (R Development Core Team 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados expuestos en este documento son preliminares pues pertenecen a un proyecto en curso y parte de los datos aún están siendo analizados.

De acuerdo con los objetivos, los datos fueron analizados por separado (morfológicos y genéticos) y combinados, para cada uno de los análisis propuestos, de tal forma que para cada sección analizada, se presentarán tres figuras, que corresponden a los datos morfológicos, datos genéticos (microsatélites) y combinados (datos morfológicos y genéticos). Los resultados del análisis de componentes principales para los datos genéticos, morfológicos y ambos combinados se muestran en las figuras 3 a la 5, respectivamente. Es posible notar como el análisis de los datos morfológicos alcanza un mayor porcentaje de variancia explicada (77%), seguido de los datos combinados (51%) y los datos genéticos (44%), mientras que el 95% de la variación es explicada por 14, 45 y 48 componentes, respectivamente.

Sin embargo, esto puede ser un efecto de la diferencia en la cantidad de variables evaluadas, 11 variables morfológicas (23 en total), mientras que los datos genéticos contienen en su análisis 294 variables binarias exclusivas dadas por las bandas detectadas (306 en total) y los datos combinados utilizan 305 correspondientes a la suma de las variables exclusivas de ambos grupos de variables (317 en total), esto debido a que todos los grupos comparten 12 variables con información adicional de cada clon. Esto explica también la mayor dispersión de los datos genéticos y combinados (Figuras 3b-d, 4b-d y 5b-d).

Al observar las figuras 6 a 8 es posible notar que se forman grupos que como se esperaba estuvieran emparentados por la utilización de bases genéticas estrechas o específicas, tal es el caso de las variedades RD, LAICA, Hawainas, etc.

Por otro lado en la figura 9, donde se comparan el origen de los cruces con respecto a los grupos, es posible ver como hay una mayor distribución de las variedades entre los grupos cuando se analizan datos genéticos, que cuando se utilizan sólo morfológicos (Cuadro 7) .

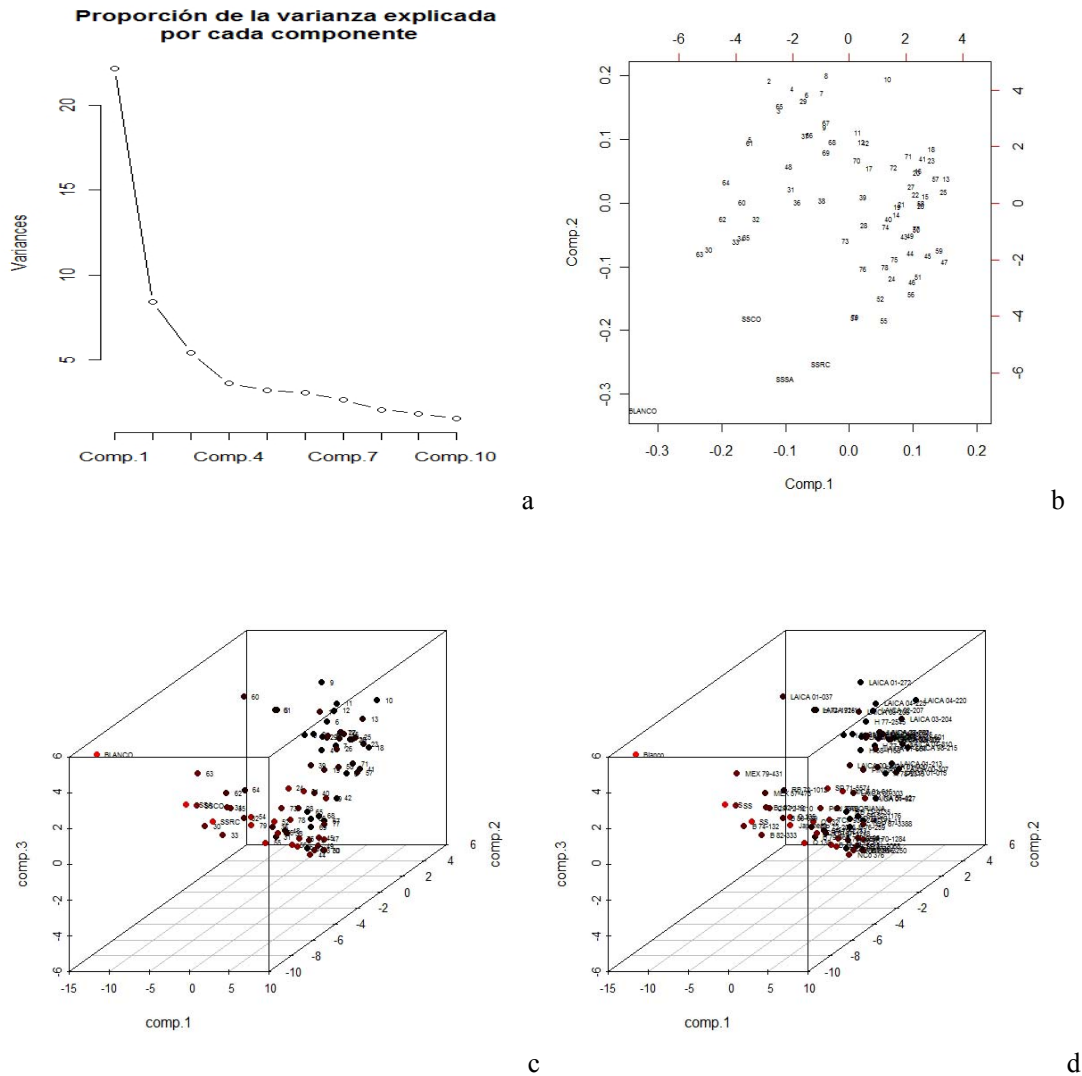
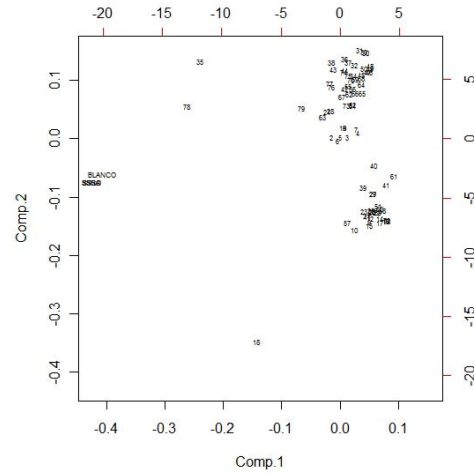
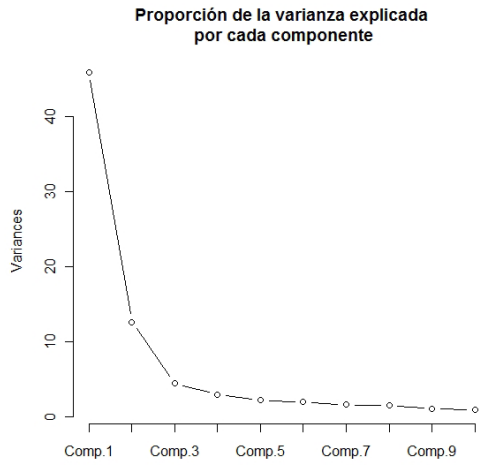
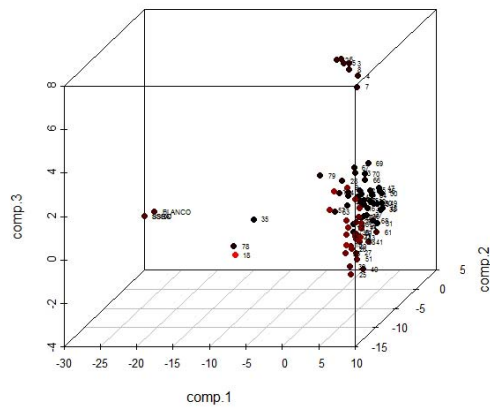


Figura 3. Análisis de componentes principales para los datos genéticos, a) Variancia explicada por cada uno de los primeros componentes, b) Dispersión de los datos entre las componentes 1 y 2, c-d) Dispersión de los datos entre las primeras tres componentes.

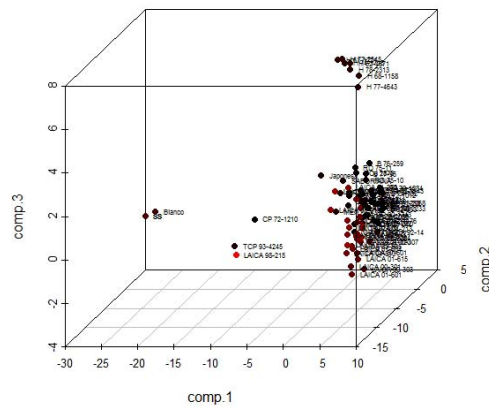


a

b

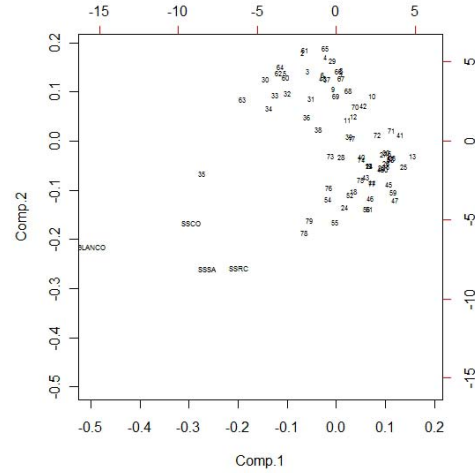
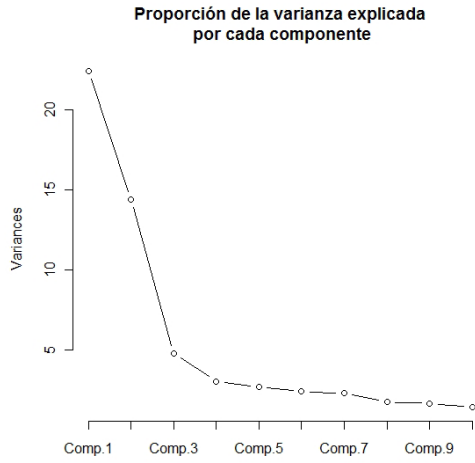


c



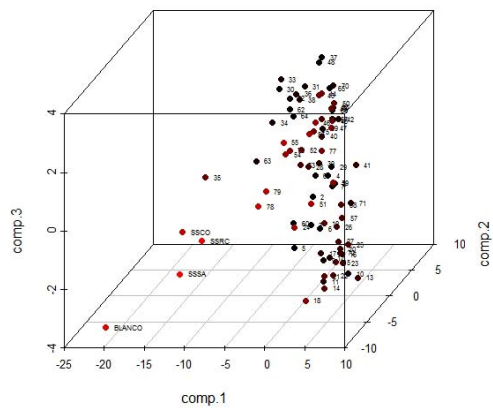
d

Figura 4. Análisis de componentes principales para los datos morfológicos, a) Variancia explicada por cada uno de los primeros componentes, b) Dispersión de los datos entre las componentes 1 y 2, c-d) Dispersión de los datos entre las primeras tres componentes.

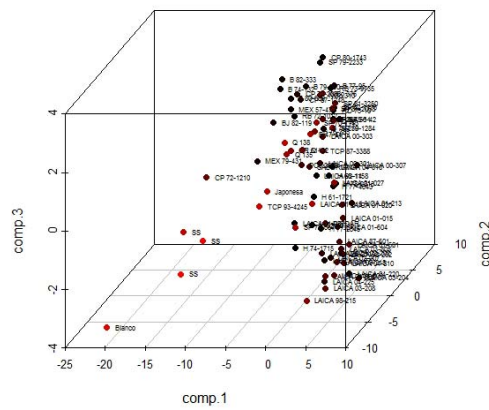


a

b

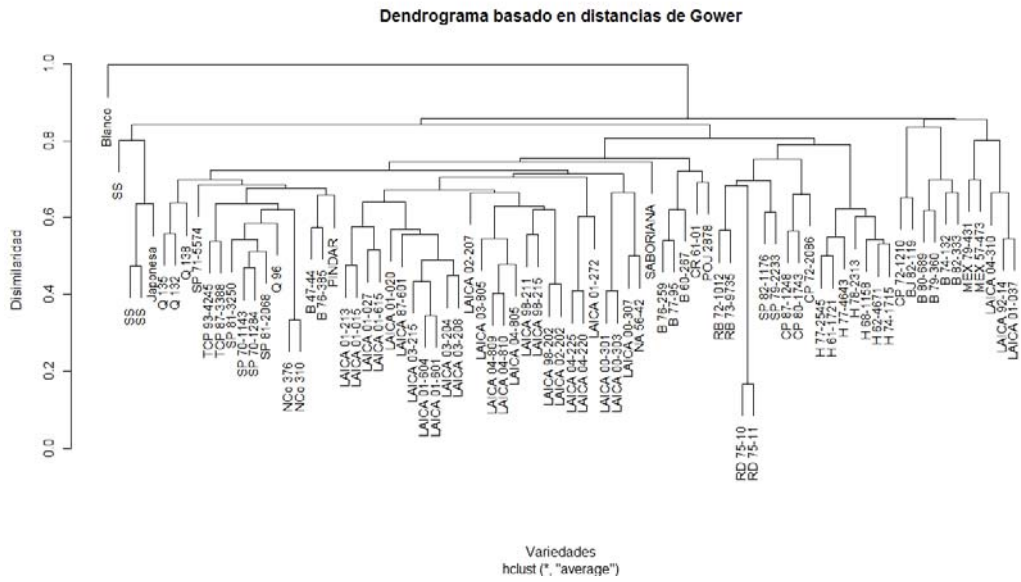


c

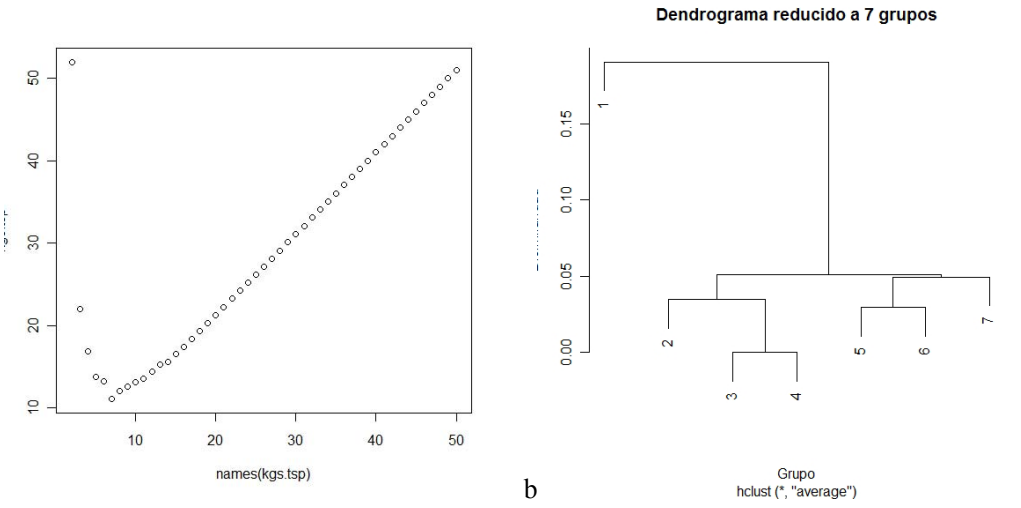


d

Figura 5. Análisis de componentes principales para los datos morfológicos y genéticos combinados, a) Variancia explicada por cada uno de los primeros componentes, b) Dispersión de los datos entre las componentes 1 y 2, c-d) Dispersión de los datos entre las primeras tres componentes.



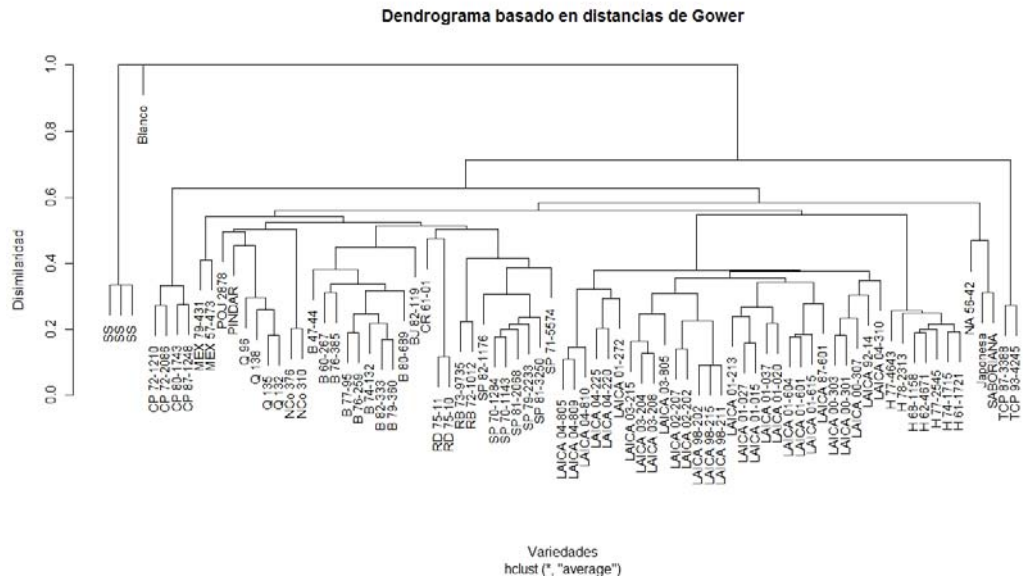
a



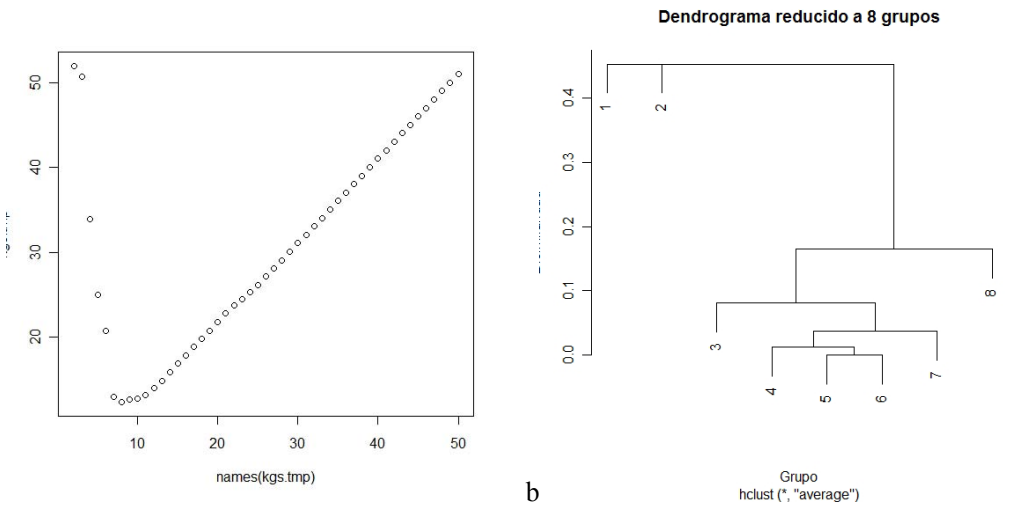
b

c

Figura 6. Análisis de conglomerados para los datos genéticos, a) Dendrograma completo, b) Prueba de Kelley-Gardner-Sutcliffe mostrando que el número óptimo de grupos es 7, c) Dendrograma de grupos reducido a 7 grupos usando *clip.clust()*.



a



c

Figura 7. Análisis de conglomerados para los datos morfológicos, a) Dendrograma completo, b) Prueba de Kelley-Gardner-Sutcliffe mostrando que el número óptimo de grupos es 8, c) Dendrograma de grupos reducido a 8 grupos usando *clip.clust()*.

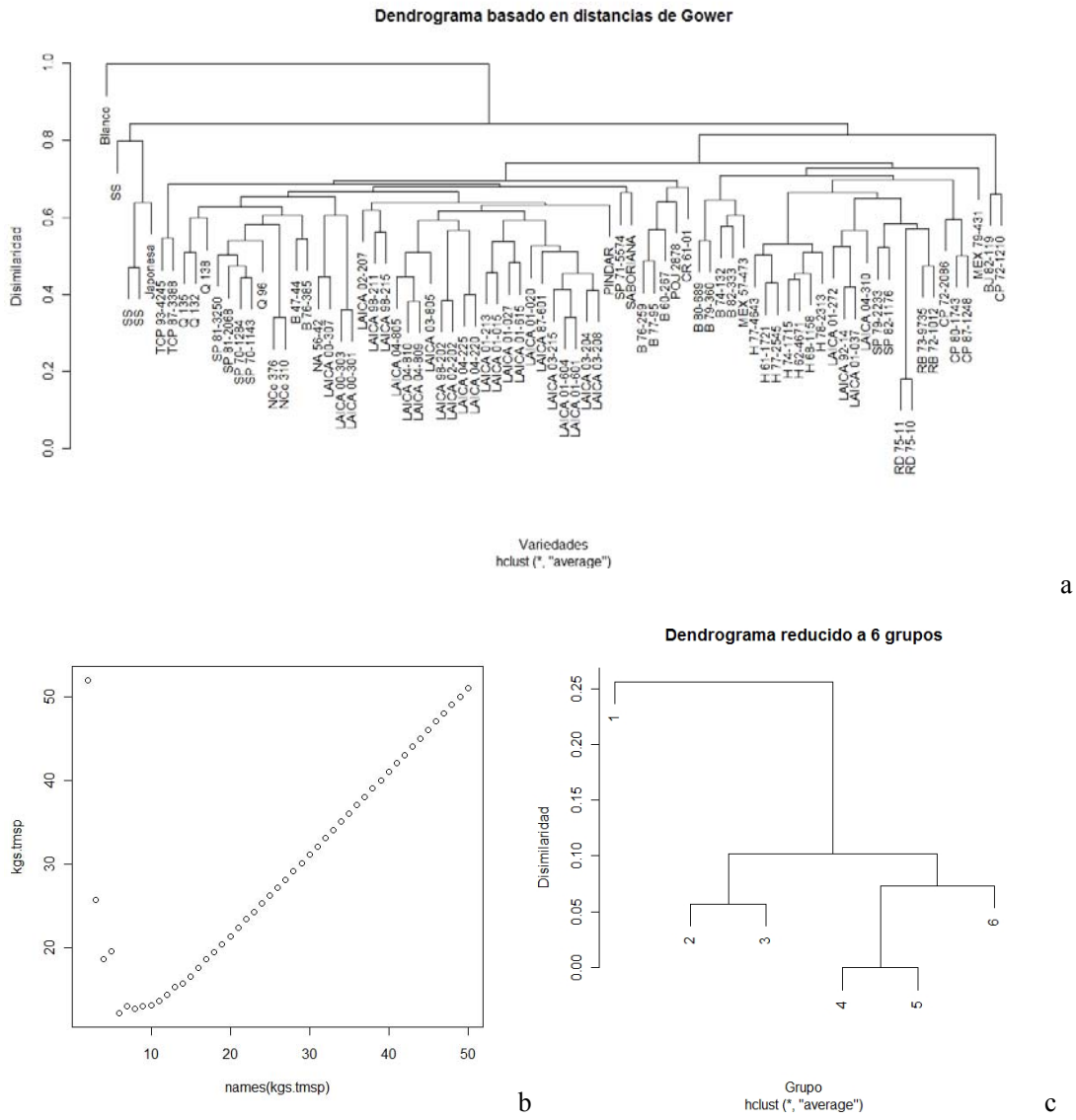
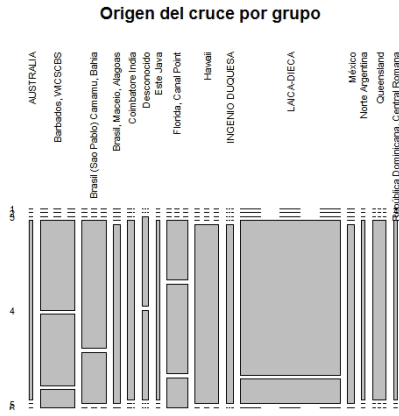
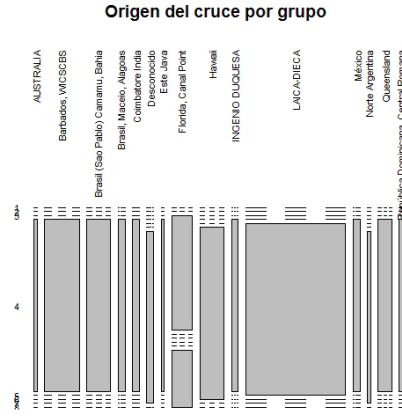


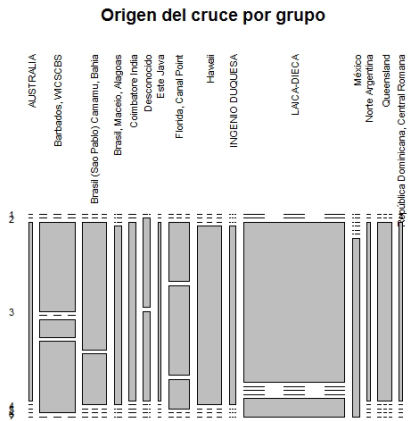
Figura 8. Análisis de conglomerados para los datos morfológicos y genéticos combinados, a) Dendrograma completo, b) Prueba de Kelley-Gardner-Sutcliffe mostrando que el número óptimo de grupos es 6, c) Dendrograma de grupos reducido a 6 grupos usando *clip.clust()*.



a



b



c

Figura 8. Origen del cruce por grupos utilizados en los diferentes tipos de datos: a) Datos combinados, b) Datos Morfológicos, c) Datos Genéticos.

Cuadro 7. Distribución de las variedades en las tres versiones de agrupamiento utilizadas.

Variedad	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	Variedad	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6
B 47-44		X								X							X					LAICA 03-215			X								X										
B 60-267			X								X							X				LAICA 03-805			X								X										
B 74-132			X									X							X			LAICA 04-220			X								X										
B 76-259			X								X							X				LAICA 04-225			X								X										
B 76-385			X								X							X				LAICA 04-310			X					X			X					X					
B 77-95			X								X							X				LAICA 04-805			X								X										
B 79-360			X									X							X			LAICA 04-809			X								X										
B 80-689			X									X							X			LAICA 04-810			X								X										
B 82-333			X									X							X			LAICA 87-601			X								X										
BJ 82-119			X									X							X			LAICA 92-14			X					X			X					X					
Blanco	X								X							X						LAICA 98-202	X			X					X			X									
CP 72-1210		X										X							X			LAICA 98-211			X								X										
CP 72-2086		X										X							X			LAICA 98-215			X								X										
CP 80-1743		X										X							X			MEX 57-473			X					X			X					X					
CP 87-1248		X										X							X			MEX 79-431			X					X			X					X					
CR 61-01			X									X							X			NA 56-42				X							X										
H 61-1721				X								X							X			NCo 310			X								X										
H 62-4671				X								X							X			NCo 376			X								X										
H 68-1158				X								X							X			PINDAR			X								X										
H 74-1715				X								X							X			POJ 2878			X								X										
H 77-2545				X								X							X			Q 132			X								X										
H 77-4643				X								X							X			Q 135			X								X										
H 78-2313				X								X							X			Q 138			X								X										
Japonesa					X				X							X						Q 96			X						X		X										
LAICA 00-301				X								X							X			RB 72-1012			X								X										
LAICA 00-303				X								X							X			RB 73-9735			X								X										
LAICA 00-307				X								X							X			RD 75-10			X								X										
LAICA 01-015				X								X							X			RD 75-11			X								X										
LAICA 01-020				X								X							X			SABORIANA				X							X										
LAICA 01-027				X								X							X			SP 70-1143			X								X										
LAICA 01-037				X									X						X			SP 70-1284			X								X										
LAICA 01-213				X								X							X			SP 71-5574			X								X										
LAICA 01-272				X								X							X			SP 79-2233			X								X										
LAICA 01-601				X								X							X			SP 81-2068			X								X										
LAICA 01-604				X								X							X			SP 81-3250			X								X										
LAICA 01-615				X								X							X			SP 82-1176			X								X										
LAICA 02-202				X								X							X			SS	3								3						X	2					
LAICA 02-207				X								X							X			TCP 87-3388				X							X										
LAICA 03-204				X								X							X			TCP 93-4245				X							X										
LAICA 03-208				X								X							X							X							X										

CONCLUSIONES

- 1) Es necesario aclarar que los datos y los análisis son preliminares y por lo tanto, las conclusiones generadas hasta ahora a partir de ellos, tan sólo demuestran un acercamiento a lo que podría ser un resultado final y concluyente.
- 2) Con los datos analizados se puede concluir que al utilizar datos genéticos se puede optimizar el agrupamiento de materiales al reducir el número de grupos.
- 3) Los agrupamientos realizados con datos morfológicos demuestran que mayor cantidad de la varianza es explicada por la misma cantidad de componentes que con los datos genéticos o combinados entre sí.
- 4) La aplicación de los datos de la tercera fase de este estudio (datos anatómicos) es posible que se pueda tener mayor evidencia para crear un número óptimo de los tres tipos de información con el que se pueda discriminar materiales vegetales.

REFERENCIAS

Eliminado: ¶
¶

- 1) Aljanabi, S.; Parmessur, Y.; Dookun, A. 2001. Microsatellites: a molecular marker technology for genetic mapping and fingerprinting of sugarcane. *Revue Agricole et Sucriere*. 81: 9-16.
- 2) Aponte, F.A.; Durán, J.R.; Riggioni, J.G. 1984. Catálogo de variedades. San José, Costa Rica. 44 p.
- 3) Artschwager, E. 1925. Anatomy of the vegetative organs of sugar cane. *Journal of Agricultural Research* 30(3): 197-242.
- 4) Artschwager, E. 1930. A comparative study of the stem epidermis of certain sugarcane varieties. *Journal of Agricultural Research* 41(12): 853-866.
- 5) Artschwager, E. 1940. Morphology of the vegetative organs of sugarcane. *Journal of Agricultural Research* 60(8): 503-550.
- 6) Australian Government. 2004. The Biology and Ecology of Sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) in Australia. Office of Gene Technology Regulator, Department of Health and Ageing, Australian Government. 31p.
- 7) Berding, N.; Hogarth, M. y Cox, M. 2004. Plant Improvement of Sugarcane. *In Sugarcane*. 2ª ed. Ed. por James. G. Blackwell Science, Oxford, UK. 20-53 p
- 8) Bolaños, J. 2006. Conv. pers. Ingeniero agrónomo de la Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar.

- 9) Balakrishnan, R.; Nair, N.V.; Sreenivasan, T.V. 2000. A method for establishing a core collection of *Saccharum officinarum* L. germplasm based on quantitative-morphological data. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 47:1-9.
- 10) Brown, J.S.; Schnell, R.J.; Power, E.J. 2007. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter- and intra species relationships using microsatellites markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54: 627-648.
- 11) Chávez, M.; Rodríguez, M.; Alfaro, R.; Villalobos, C.; Angulo, A.; Barrantes, J.; Calderón, G.; Rodríguez, J. 2004. Censo de variedades de caña de azúcar sembradas en Costa Rica Año 2003. Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar, Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar. San José, Costa Rica. 126 p.
- 12) Chen, J.C.P.; Chou, C. C. Cane Sugar Handbook. 12th Edition. John Wiley & Sons. New York. 1993.
- 13) Cordeiro, G.M.; Pan, Y.B.; Henry, R. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant. Sci.* 165: 181-189.
- 14) Durán, J.R. 2006. Conv. pers. Ingeniero Agrónomo de la Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar.
- 15) Durán, J.R. y M. Oviedo. 2006. Experiencias y resultados obtenidos con los cruzamientos genéticos y la búsqueda de nuevas variedades de caña de azúcar de la serie LAICA en Costa Rica. *In* Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Centroamérica, ATACA (XVI: San José, Costa Rica, 1-4 Agosto, 2006) Memoria/Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Centro América, ATACA. – San José, Costa Rica: Asociación de Azucareros de Costa Rica, ATACORI, 2006. Tomo II: 995 p.
- 16) Flores, S. 2001. Las variedades de caña de azúcar en México. México. 308 p.
- 17) Gallacher, D.J. 1994. Development of a minimum descriptor set for individuals of *Saccharum spp.* Hybrid germplasm. Ph.D. Dissertation, James Cook University, Townsville. 321 p.
- 18) Gallacher, D.J. 1997a. Evaluation of sugarcane morphological descriptors using variance component analysis. *Australian Journal of Agricultural Research* 48(6):769-774.
- 19) Gallacher, D.J. 1997b. Optimized descriptors recommended for Australian sugarcane germplasm (*Saccharum spp.* hybrid). *Australian Journal of Agricultural Research* 48(6):775-780.
- 20) Gallacher, D.J.; Berding, N. 1997. Purpose, selection and application of descriptors for sugarcane germplasm. *Australian Journal of Agricultural Research*
- 21) McCouch, S.R.; G. Kochert, Z.H.; Yu, Z.Y.; Wang, G.S.; Khush, W.R.; Coffman y S.D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of ricechromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76: 815-829.
- 22) Moore, P.H. 1987. Anatomy and Morphology. p: 85-142. *In*: Heinz, D.J. (Ed). Sugarcane improvement through breeding. N.Y., U.S.A.
- 23) Pla, L.E. 1986. Análisis multivariado: método de componentes principales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA). Washington, D.C. 95 p.
- 24) Powell, W.; Machray, G.; Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trend. Plant. Sci.* 1: 215-221.

- 25) R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- 26) Rojas, W. 2003. Caracterización Morfológica de Germoplasma Estudios de Casos. Caso1. Análisis de la variabilidad genética en quinua. p: 27-39. *In*: T.L. Franco; R. Hidalgo (eds). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Cali, Colombia.
- 27) Subirós, J. C. 1998. Calidad del jugo y contenido de fibra de tres variedades de caña de azúcar en un ciclo de crecimiento en guanacaste, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 22 (2): 173-184.
- 28) University of Florida. 2002. Sugarcane Botany: A brief view. Agronomy Department, Extension Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 6 p.