

DIVERSIDAD GENÉTICA BASADA EN MARCADORES MOLECULARES DE UNA COLECCIÓN DE CLONES DEL COMPLEJO *Saccharum* UTILIZADOS EN EL PROGRAMA DE INTROGRESIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN CUBA

O. Coto[✉], María T. Cornide, Mayra Rodríguez, Ingrid Hernández, E. Canales, F. de Prada y G. Pérez

ABSTRACT. At present, the greatest limitation of sugarcane breeding is its reduced genetic base. Molecular markers have become a useful tool for researchers and plant breeders to explore the available genetic variability in crop gene pool, looking for a better profitability of such collection. In this paper, a sugarcane collection composed by 89 *Saccharum* complex clones, previously chosen for their outstanding vigor and resistance to major diseases, is studied. The clones used in the introgression of sugarcane are from *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi* and *S. sinense* species, *Erianthus* genus and a group of wild clones collected in Laos, useful for crop breeding. They were previously characterized for their agronomical performance under germplasm bank conditions and the molecular genetic diversity detected enabled to classify genotypes in four groups employing six RFLP descriptors and *Saccharum* specific primers previously reported. Their genetic diversity revealed by agronomical components, resistance to main diseases as well as their molecular groups were employed to recommend sources to increase the genetic base of the Cuban introgression program of sugarcane.

Key words: genetic variation, *Saccharum*, germplasm collections, genetic markers, plant breeding

RESUMEN. La mayor limitación del mejoramiento genético de la caña de azúcar en los momentos actuales es su reducida base genética. Los marcadores moleculares se han convertido en una herramienta útil para investigadores y mejoradores, con el objetivo de explorar la variabilidad genética disponible en las colecciones de germoplasma, buscando un mejor aprovechamiento de la variabilidad genética disponible. En el presente trabajo se resume el estudio de una colección compuesta por 89 clones del complejo *Saccharum* seleccionados previamente por su vigor y resistencia a las principales enfermedades; estos clones son utilizados en el programa de introgresión de la caña de azúcar en Cuba. En la colección están representadas las especies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense*, el género *Erianthus* y un grupo de clones silvestres de interés para el mejoramiento de este cultivo colectados en Laos. Los clones estudiados fueron previamente caracterizados mediante su comportamiento agronómico en condiciones de banco de germoplasma. La diversidad genética molecular detectada permitió clasificar a los genotipos evaluados en cuatro grupos de diversidad genética mediante seis descriptores moleculares y cebadores específicos de *Saccharum* spp. previamente informados. La diversidad genética, revelada mediante componentes agronómicos, su resistencia a las principales enfermedades y los grupos de diversidad molecular detectados en el presente trabajo, se utilizaron para la recomendación de fuentes genéticas, con el objetivo de incrementar la base genética del programa de introgresión de este cultivo en Cuba.

Palabras clave: variación genética, *Saccharum*, colecciones de material genético, marcadores genéticos, fitomejoramiento

Dr.C. O. Coto, Investigador Auxiliar del Departamento de Mejoramiento y Atención a las Plantaciones, Grupo de Mejoramiento Genético, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), Ave. 7ma. entre calle 30 y 32, Playa; Dra.C. María T. Cornide, Investigador Titular del Departamento de Genética, Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), MINAZ; Ms.C. Mayra Rodríguez, Investigador Auxiliar del Departamento de Genómica Funcional de Plantas; Ingrid Hernández, Investigador Agregado y Ms.C. E. Canales, Investigador Auxiliar del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB); Dr.C. F. de Prada, Investigador Auxiliar y Dr.C. G. Pérez, Investigador Titular del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ orlandocoto@inica.edu.cu

INTRODUCCIÓN

La principal limitación del mejoramiento genético de la caña de azúcar radica en su reducida base genética; los cultivares modernos descienden de unos pocos clones ancestrales o clones de fundación, como también se les conoce de *Saccharum spontaneum* y *Saccharum officinarum* (1, 2), las dos especies reconocidas como domesticadas (3). Su origen citoplasmático es aún más limitado al estar representado por unos pocos clones de *Saccharum officinarum* (tres a cinco clones) (2, 4).

En este sentido, varios programas de mejoramiento realizan esfuerzos para ampliar dicha base genética me-

dianter la utilización de germoplasma silvestre, especies del género *Erianthus* Michx. sect. *Ripidium* Henrad y clones de *S. spontaneum*, como fuentes de caracteres útiles relacionados con la resistencia a enfermedades, la tolerancia a estrés y el aumento del retoñamiento y el vigor (5, 6).

Por otra parte, los marcadores del polimorfismo de ADN (marcadores moleculares) son herramientas valiosas para los estudios genéticos en plantas y en algunos casos están siendo ya empleados exitosamente en la elección de progenitores y en la selección en la caña de azúcar (7). Varios tipos de marcadores moleculares y estrategias de mejoramiento se encuentran a disposición de mejoradores y genetistas, que permiten vencer muchas de las limitaciones de los programas de mejoramiento tradicional (8).

Varios han sido los tipos de marcadores moleculares utilizados para evaluar la diversidad genética del germoplasma del género *Saccharum*; entre los marcadores moleculares iniciales se encuentran las isoenzimas y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLP). El desarrollo posterior de los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), entre los que se incluye el polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar (*Random Amplified Polymorphism DNA*, RAPD), el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*, AFLP) y los microsatélites, ha permitido realizar una caracterización genética más refinada de las colecciones de germoplasma (9).

Las colecciones de germoplasma son componentes importantes de los programas de mejoramiento vegetal, al proporcionar a los mejoradores de fuentes de caracteres útiles. Las investigaciones realizadas, impulsadas por la aparición de nuevas enfermedades y plagas, unido al empobrecimiento gradual de los suelos y la necesidad de aumentar los rendimientos, obligan a disponer de una base genética más amplia, y se hace necesaria la incorporación de nuevos genotipos. La estrecha base genética empleada se considera entre las principales limitaciones del mejoramiento cañero tradicional vía casi exclusiva de obtención de nuevas variedades, tanto por la escasa representación de formas originales como por la elevada consanguinidad entre los híbridos utilizados como progenitores. El trabajo de mejora en Cuba no ha sido una excepción, nuestras variedades provienen de un grupo reducido de formas originales conocidos como clones de fundación (10).

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- ↪ Determinar los grupos de diversidad molecular presentes en una colección de clones del complejo *Saccharum*, para asistir a la recomendación de progenitores en el programa de mejoramiento de este cultivo.
- ↪ Recomendar fuentes genéticas novedosas como progenitores para el mejoramiento.

- ↪ Confirmar el valor práctico de los descriptores moleculares para la identificación taxonómica de clones del complejo *Saccharum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se analizaron 89 formas originales, representantes de los cuatro grupos de comportamiento agroproductivo presentes en el germoplasma previamente informados (11). Están representadas: 34 formas silvestres de origen desconocido (clones ECL); 30 clones *S. officinarum* y un híbrido simple; *S. spontaneum* (9); *S. robustum* (2); *S. barberi* (3); *S. sinense* (6) y *Erianthus* spp. (4) (Tabla I).

Todas las muestras vegetales fueron suministradas por el banco de germoplasma de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar del INICA en Matanzas.

Análisis molecular. El ADN genómico total de cada genotipo se aisló a partir de hojas liofilizadas (12), y fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI* y *EcoRV*, según las recomendaciones del fabricante (*Amersham*). Las electroforesis para la separación de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa 0.8 % en buffer TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y las transferencias de los fragmentos a membranas de nylon (Hybond N+, *Amersham*) se realizaron por el procedimiento alcalino (NaOH 0.4 N). Se empleó el método de marcaje radioactivo de las sondas con ³²P utilizando juegos de cebadores arbitrarios (*Amersham*) (12). Los pesos moleculares se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular Raoul I (*Appligene*).

Amplificación con cebadores específicos de *Saccharum* spp. Se realizó la amplificación del r-ADN 5S con los cebadores informados positivos en las especies *Erianthus arundinaceus* (fragmento de 500 bp) y *Saccharum officinarum* y *Saccharum robustum* (fragmento de 320 bp) (14) y correspondientes a las secuencias:

5'-GTGACCTCCTGCGAAGTCCT-3'
5'-CCCATCCGTGTACTACTCTC-3'

La reacción se realizó empleando 5 ng de ADN genómico de cada genotipo como molde y usando el siguiente programa: un ciclo de 3 min a 94°C; 27 ciclos de 55 seg a 93°C; 15 seg a 55°C y 30 seg a 72°C (14). Los resultados de todas las amplificaciones fueron analizados en geles de agarosa 1.5 % en buffer TBE a 10 V/cm. Los pesos moleculares se determinaron por comparación utilizando como marcador de peso molecular un Ladder de 1 kilobase (*Appligene*).

Análisis de la diversidad genética mediante RFLP citoplasmáticos. La determinación de los grupos de diversidad citoplasmática presentes en la colección se realizó utilizando seis marcadores RFLP previamente informados (15) y revelados mediante las siguientes sondas: una sonda de cloroplasto, la subunidad larga de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (Grd Rubisco) de espinaca, que revela los fragmentos HC₁₃ específico de clones de *Erianthus* spp. y BC7 característico de clones ECL del citofondo E y las siguientes sondas mitocondriales de la

Tabla I. Composición de la colección de clones del complejo *Saccharum* estudiada

Cód.	Nombre	Origen*	Cód.	Nombre	Origen*	Cód.	Nombre	Origen*
1	<i>E. sara</i>	<i>Erianthus</i> spp.	31	ECL4-3-85	Desconocido	61	IJ 8001	<i>S. officinarum</i>
2	<i>E. elegans</i>	<i>Erianthus</i> spp.	32	ECL6-8-85	Desconocido	62	IJ 8002	<i>S. officinarum</i>
3	NC100	<i>Erianthus</i> spp.	33	ECL6-7-85	Desconocido	63	PSA49	<i>S. officinarum</i>
4	ECL6-10-85	Desconocido	34	Nagori	<i>S. spontaneum</i>	64	51NG92	<i>S. officinarum</i>
5	ECL1-30-85	Desconocido	35	ECL1-31-85	Desconocido	65	Tibbo Mird	<i>S. officinarum</i>
6	ECL1-24-85	Desconocido	36	Mandalay	<i>S. spontaneum</i>	66	Keong Java	<i>S. officinarum</i>
7	ECL 6-6-85	Desconocido	37	Burma	<i>S. spontaneum</i>	67	Migronne	<i>S. officinarum</i>
8	ECL5-4-85	Desconocido	38	SH244	<i>S. spontaneum</i>	68	Ajax	<i>S. officinarum</i>
9	ECL1-7-85	Desconocido	39	SES13	<i>S. spontaneum</i>	69	28NG15	<i>S. officinarum</i>
10	ECL1-33-85	Desconocido	40	SES182	<i>S. spontaneum</i>	70	NC30	<i>S. officinarum</i>
11	ECL1-26-85	Desconocido	41	Tabongo	<i>S. spontaneum</i>	71	NC39	<i>S. officinarum</i>
12	ECL1-12-85	Desconocido	42	US56-15-8	<i>S. spontaneum</i>	72	NC33	<i>S. officinarum</i>
13	ECL1-18-85	Desconocido	43	ECL3-3-85	Desconocido	73	NC80	<i>S. officinarum</i>
14	ECL1-32-85	Desconocido	44	ECL1-35-85	Desconocido	74	Cristalina	<i>S. officinarum</i>
15	ECL1-8-85	Desconocido	45	ECL6-1-85	Desconocido	75	Horne	<i>S. officinarum</i>
16	ECL1-10-85	Desconocido	46	51NG63	<i>S. robustum</i>	76	Badila	<i>S. officinarum</i>
17	ECL1-6-85	Desconocido	47	51NG91	<i>S. robustum</i>	77	Areneta	<i>S. officinarum</i>
18	ECL1-19-85	Desconocido	48	Japonesa	<i>S. sinense</i>	78	Loethers	<i>S. officinarum</i>
19	ECL1-37-85	Desconocido	49	Cayana 10	<i>S. sinense</i>	79	Rarotonga 2	<i>S. officinarum</i>
20	ECL1-15-85	Desconocido	50	Oshima	<i>S. sinense</i>	80	H. Broewang	<i>S. officinarum</i>
21	ECL1-17-85	Desconocido	51	Uba	<i>S. sinense</i>	81	B. Hitan	<i>S. officinarum</i>
22	ECL1-36-85	Desconocido	52	Uba de Natal	<i>S. sinense</i>	82	Zopilota	<i>S. officinarum</i>
23	ECL3-5-85	Desconocido	53	Tekcha	<i>S. sinense</i>	83	Caiara	<i>S. officinarum</i>
24	ECL3-2-85	Desconocido	54	Kewali	<i>S. barberi</i>	84	B. Cheribon	<i>S. officinarum</i>
25	ECL3-8-85	Desconocido	55	Hemja	<i>S. barberi</i>	85	Rarotonga 1	<i>S. officinarum</i>
26	ECL3-10-85	Desconocido	56	Hatooni	<i>S. barberi</i>	86	Djapara Red	<i>S. officinarum</i>
27	ECL3-14-85	Desconocido	57	Chunnee	<i>S. barberi</i>	87	A. Mauritius	<i>S. officinarum</i>
28	ECL3-11-85	Desconocido	58	Morada	Desconocido	88	Morada Antigua	<i>S. officinarum</i>
29	ECL1-29-85	Desconocido	59	CP36-112	H S.	89	H. Rwandang	<i>Erianthus</i> spp.
30	ECL3-13-85	Desconocido	60	Monjet Gayan	<i>S. officinarum</i>			

* Según el catálogo del Banco del Germoplasma del INICA (13)

ECL: Expedición Cuba-Laos, HS: híbrido simple de *S. officinarum*

ATP sintetasa de maíz: subunidad 6 (ATPasa 6) que revela el fragmento IC₃, característico de *Erianthus* spp. y la subunidad 9 (ATPasa 9) que revela el fragmento VC₁₈ específico de clones de *Saccharum* spp. Estas sondas fueron gentilmente proporcionadas por el *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD).

Se utilizaron solo las bandas polimórficas, previa comprobación de su independencia mediante el coeficiente de correlación simple de Pearson ($P < 0.05$), las cuales se evaluaron de forma binaria considerando 0 como ausencia y 1 como presencia. A partir de las matrices de datos originales se calculó la similitud genética (SG_{ij}) entre cada par de genotipos (16, 17):

$$SG1 = 2a / (2a + b + c)$$

donde:

a: presencia de la banda en los genotipos *i* y *j*

b: presencia de la banda en el genotipo *i* y ausencia en *j*

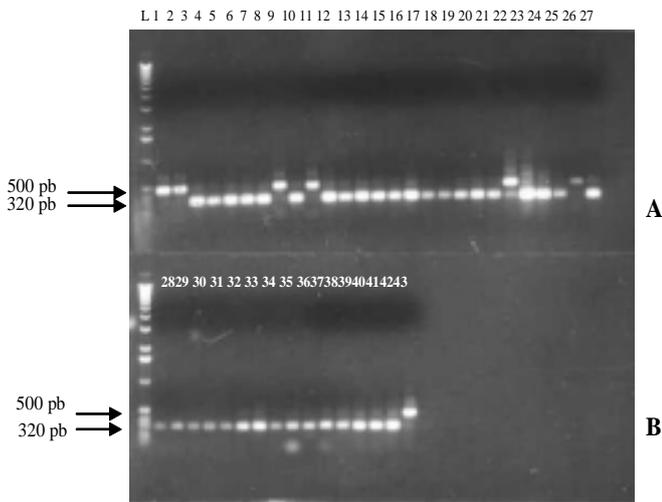
c: ausencia de la banda en el genotipo *i* y presencia en *j*

Los agrupamientos de los genotipos se efectuaron basados en los valores de disimilitud (1-SG_{ij}) entre todos los pares de clones, empleando el algoritmo secuencial aglomerativo jerárquico y anillado (SAHN, *Sequencial*

Agglomerative Hierarchical and Nested) (18). El método de agrupamiento utilizado fue el basado en la media aritmética no ponderada (UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*) mediante el paquete estadístico NTSys-pc versión 2.02i por presentar los valores cofenéticos más adecuados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación taxonómica mediante la amplificación con cebadores específicos de Saccharum spp. La amplificación del gen del r-ADN 5S permite diferenciar las especies *E. arundinaceus* (fragmentos de 500 pb) y *S. officinarum* (fragmento de 320 pb) (19). La amplificación con estos cebadores reveló la presencia de ambos tipos de bandas en los clones de la colección estudiada (Figura 1). Los resultados confirmaron los obtenidos previamente en un grupo de 11 clones silvestres (ECL) (20) y en los genotipos testigos de *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* y *Erianthus* spp., así como permitieron determinar la contribución nuclear de *Saccharum* spp. y *Erianthus* spp. en clones *Erianthus* spp., *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* y nuevos silvestres ECL.



L. Ladder 1-kb

Carriles en A: 1.ECL 1-31-85, 2.ECL 1-24-85, 3.ECL 1-6-85, 4.ECL 1-7-85, 5.ECL 1-8-85, 6.ECL 1-10-85, 7.ECL 1-12-85, 8.ECL 1-30-85, 9.ECL 1-14-85, 10.ECL 6-6-85, 11.ECL 1-15-85, 12.ECL 1-17-85, 13.ECL 1-18-85, 14.ECL 1-19-85, 15.ECL 1-26-85, 16.ECL 1-32-85, 17.ECL 1-33-85, 18.ECL 1-36-85, 19.ECL 1-37-85, 20.ECL 3-1-85, 21.ECL 3-2-85, 22.ECL 5-4-85, 23.ECL 6-10-85, 24.ECL 6-7-85, 25.ECL 6-8-85, 26.ECL 1-29-85, 27.ECL 3-3-85

Carriles en B: 28.ECL 3-5-85, 29.ECL 3-8-85, 30.ECL 3-13-85, 31.ECL 3-10-85, 32.ECL 3-14-85, 33.ECL 3-11-85, 34.ECL 3-15-85, 35.NC 100, 36.ECL 4-3-85, 37.Tabongo, 38.SH 244, 39.SES 13, 40.SES 182, 41.Horne, 42.Black Cheribon, 43. *Erianthus elegans*
pb: pares de base

Figura 1. Identificación taxonómica de los clones ECL y un grupo de clones de la colección utilizando cebadores específicos del gen del ADN ribosomal 5S

Estos resultados están en concordancia con los informados en la literatura (19, 21), donde se han detectado variaciones en el gen del ADN ribosomal 5S de clones *S. spontaneum*, *S. officinarum* y *E. arundinaceus* con estos cebadores. Los resultados alcanzados en el presente trabajo permiten informar, por primera vez, amplificación con este par de cebadores para las especies *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *E. elegans* y *E. sara*.

Determinación de grupos de diversidad citoplasmática. En la Figura 2 se presenta a modo de ejemplo una de las radiografías obtenidas, a partir de las cuales se obtuvo el agrupamiento de los genotipos estudiados basados en el polimorfismo citoplasmático detectado. En la Figura 3 se observan cuatro grupos de diversidad (I-IV), los cuales se describen a continuación:

- El grupo I, en él se ubican los tres clones testigos de *Erianthus spp.* Este fondo genético es coincidente con el citofondo D presentado previamente (13), adicionándose a este grupo el clon ECL 6-1-85 no evaluado anteriormente, resultado que evidencia la presencia de un nuevo citofondo en la colección de clones ECL.
- El grupo II, que comprende la totalidad de los clones *Saccharum robustum* (subgrupo B1), *S. spontaneum* (subgrupo B2) y todos los clones ECL, excepto cuatro

de estos. Este grupo coincide con los citofondos B y C presentados (15), trabajo realizado con un grupo menor de clones. No hay bandas propias de todos los miembros de este grupo que los diferencie del grupo III; la identificación del subgrupo B1 debe efectuarse sobre la base de los descriptores botánicos de *S. robustum* en relación con los clones de *S. officinarum* (grupo III), ya que ambos son portadores de los marcadores VC₁₈ (*EcoR* V-ATPasa9) y BC₁₀ (*BamH* I-ATPasa6); por otra parte, el subgrupo B2 (*S. spontaneum*) se diferencia del subgrupo B1 y del grupo III por la ausencia del marcador BC₁₀.

- El grupo III, incluye la totalidad de los genotipos *S. officinarum*, *S. barberi* y *S. sinense*, con excepción de la variedad Japonesa, la cual presenta un origen dudoso. Este fondo genético coincide con el citofondo A presentado (15). Todos sus miembros muestran los marcadores de grupo VC₁₈, BC₁₀ y HC₁₃ (Grd. Rubisco) asociados al género *Saccharum* y carecen del fragmento BC₂₈ (*BamH* I-ATPasa 6).

- Finalmente, el grupo IV incluye a los clones ECL del citofondo E previamente informado (15). Los representantes de este grupo de diversidad presentan los marcadores asociados al mismo BC₇ (*BamH* I-Grd. Rubisco) y BC₁₄ (*BamH* I-ATPasa 6).

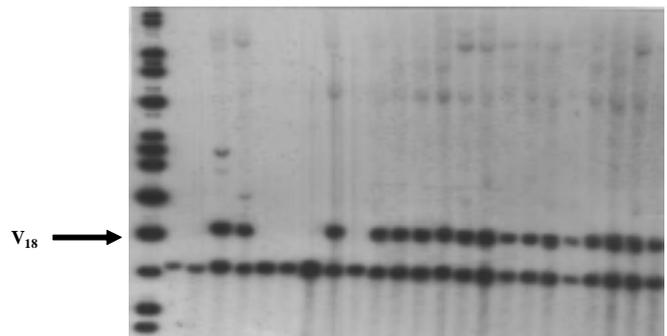
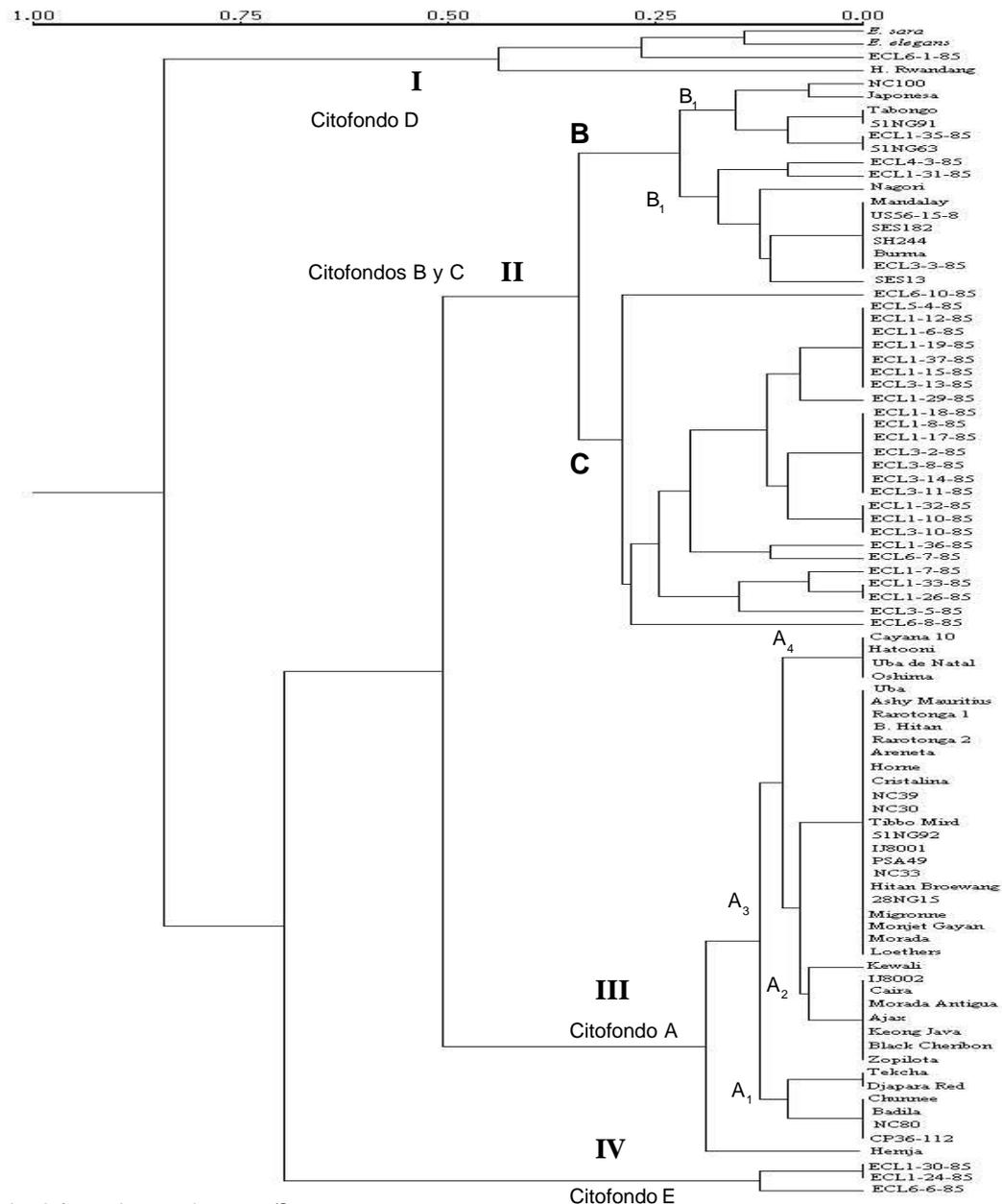


Figura 2. Resultado de la combinación enzima sonda *EcoR* V – ATPasa 9. La banda VC18 está presente en los clones ECL localizados en el grupo de diversidad citoplasmática II (carriles 8, 10-25). Este fragmento está ausente en el resto de los clones ECL ubicados en los grupos I y IV (carriles 5-7, 9) y en los clones testigos *E. sara* y *E. elegans* (carriles 1 y 2)

Nuevamente la diferenciación entre los subgrupos B2, detectada en este trabajo, y el grupo C informado (15) (VC₁₈ + BC₁₀) debe apoyarse en descriptores botánicos, o bien, en los RFLP específicos del fondo ECL presentado anteriormente (20). El empleo del marcador BC₂₈ (*BamH* I-ATPasa 6) de muy alta frecuencia en el grupo C y presente por excepción en el subgrupo B2 puede corroborar también la clasificación botánica.

El fondo de diversidad citoplasmático A presentado en el estudio previo considerando un número menor de genotipos (15), cuyos clones son resaltados en la Tabla II, puede ser subdividido ahora en cuatro citofondos.



A-E: citofondos informados previamente ¹⁵
 ECL: clones Expedición Cuba-Laos ¹³

Figura 3. Análisis de conglomerados de los estimados de distancia basados en el polimorfismo citoplasmático

Tabla II. Nuevos fondos de diversidad molecular detectados en el citofondo A previamente informado

Subgrupos				
A1	A2		A3	A4
Badila (o)	Morada Antigua (o)	Ashy Mauritius (o)	NC 39 (o)	Oshima (si)
Djapara Red (o)	Ajax (o)	Rarotonga 1 (o)	NC 30 (o)	Uba de Natal (si)
NC 80 (o)	Black Cheribon (o)	Bandjarmasin Hitan (o)	28 NG 15 (o)	Cayana 10 (si)
CP 36-112 FS (o)	Keaong Java (o)	Hitan Broewang (o)	Migronne (o)	Hatooni (b)
Hemja (b)	Cairá (o)	Rarotonga 2 (o)	TibboMird (o)	
Chunnee (b)	IJ 8002 (o)	Loethers (o)	51 NG92 (o)	
Teckcha (si)	Zopilota (o)	Areneta (o)	PSA 49 (o)	
	Kewali (b)	Horne (o)	IJ 8001 (o)	
		Cristalina (o)	Monjet Gayan (o)	
		NC 33 (o)	Morada (desc)	
		Uba (si)		

b, si, o, desc: *S. barberi*, *S. sinense*, *S. officinarum* y origen desconocido, respectivamente
 En negritas genotipos evaluados previamente (15)

Recomendación de formas asistida por marcadores moleculares. Para el manejo asistido en el mejoramiento de la colección de clones ECL, se recomienda considerar los tres citofondos presentados y los dos fondos nucleares revelados por amplificación específica y que se muestran en la Tabla III.

Adicionalmente, para el manejo integral de la colección en el programa de introgresión, se propone considerar asimismo los 11 fondos de diversidad genética en los progenitores para la introducción de genes de resistencia que se muestran en la Tabla IV.

DISCUSIÓN

Los resultados alcanzados en la caracterización de germoplasma novedoso (clones ECL) son de gran utilidad para el mejoramiento genético del cultivo y apoyan informes previos en caña de azúcar, relacionados con las ventajas del uso de los marcadores moleculares basados en secuencias específicas para la identificación de clones de origen desconocido (22); de hecho, ocho de los clones ECL investigados aparecen informados, teniendo en cuenta una caracterización botánica, como clones pertenecientes al género *Miscanthus* spp. (13), por lo que los resultados de la amplificación utilizando los cebadores r-ADN 5S, demuestran que la colección cubana de caña de azúcar no tiene representantes de este género afín.

Tabla III. Fondos de diversidad molecular revelados en la colección ECL estudiada

Fondos de diversidad molecular					
C(1)S(2)			C(1)E(2)	D(1)E(2)	E(1)E(2)
ECL 1-6-85	ECL 1-26-85	ECL 3-8-85	ECL 1-29-85	ECL 6-1-85	ECL 1-24-85
ECL 1-7-85	ECL 1-32-85	ECL 3-10-85	ECL 1-31-85		ECL 1-30-85
ECL 1-8-85	ECL 1-33-85	ECL 3-11-85	ECL 5-4-85		ECL 6-6-85
ECL 1-10-85	ECL 1-35-85	ECL 3-13-85			
ECL 1-12-85	ECL 1-36-85	ECL 3-14-85			
ECL 1-15-85	ECL 1-37-85	ECL 4-3-85			
ECL 1-17-85	ECL 3-2-85	ECL 6-7-85			
ECL 1-18-85	ECL 3-3-85	ECL 6-8-85			
ECL 1-19-85	ECL 3-5-85	ECL 6-10-85			

(1): C, D y E: fondos de diversidad citoplasmática previamente reportados 15

(2): S, E: resultados de la amplificación específica fragmento de *Saccharum* y *Erianthus* respectivamente

Tabla IV. Recomendación de progenitores femeninos y masculinos asistida por los fondos de diversidad molecular detectados

Tipo de progenitor	Grupos de diversidad molecular (1)	Grupos de mejoramiento (2)			
		1	2	3	4
Femeninos	A	Chunnee	CP 36-112	51 NG 92	
		Ajax	Techa	Hatooni	
		Rarotonga 1	Kewali		
		Rarotonga 2	Hemja		
		NC 39	IJ8002		
		Uba de Natal	Morada Antigua		
		Uba	Keong Java		
		Oshima	Tibbo Mird		
		Cayana 10	NC 30		
				Migronne	
		PSA 49			
		Monjet Gayan			
	B1	NC 100	Japonesa	-	51 NG 63 51 NG 91
Masculinos	B2	US 56-15-8	-	-	-
		Burma			
		Mandalay			
	CS	ECL 1-7-85	ECL 1-32-85	-	ECL 1-26-85
		ECL 3-3-85	ECL 1-35-85		
			ECL 1-18-85		
			ECL 6-8-85		
		ECL 3-11-85			
CE	ECL 5-4-85	ECL 1-30-85	-	ECL 1-29-85	
EE	-	ECL 1-30-85	-	ECL 1-24-85 ECL 6-6-85	
DE	-	-	ECL 6-1-85		

(1): A, B1, B2, C, E; S y E: fondos de diversidad citoplasmática y amplificación específica fragmento de *Saccharum* y *Erianthus* respectivamente

(2): (1-4): Grupo de progenitores para la resistencia a estrés bióticos y abióticos (11)

La evaluación de la diversidad genética de los progenitores femeninos es particularmente importante, si se tiene en cuenta la predominancia de *S. officinarum* en el genoma de los cultivares modernos (9). Las ventajas del uso de los marcadores moleculares son evidentes, el fondo de diversidad citoplasmática A presentado en el estudio previo considerando un número menor de genotipos resaltados en la Tabla II puede ser subdividido en cuatro citofondos (15).

El polimorfismo intraespecífico detectado en los clones de *S. officinarum* estudiados en el presente trabajo es coincidente con el informe de la existencia de una considerable variación dentro de esta especie (23); esto reafirma la conveniencia de considerar los subgrupos de diversidad detectados en estos materiales, con el objetivo de hacer un uso más eficiente de su variabilidad citoplasmática a la hora de diseñar los retrocruces en el programa de introgresión (nobilización) de este cultivo.

Este resultado proporciona tanto a la colección estudiada como al germoplasma de información de utilidad en el ajuste inicial, eliminar duplicados, incluir variabilidad ausente o aumentar el conocimiento de la diversidad genética oculta en las especies. Varios tipos de marcadores moleculares se han utilizado con igual éxito, en el estudio de colecciones conformadas para caracteres cuantitativos (24, 25, 26).

En caña de azúcar, como en otros cultivos, existe una tendencia al empleo de enfoques novedosos, que pueden resultar de utilidad al mejoramiento; el establecimiento de colecciones núcleo, como la informada de *S. officinarum*, basada en datos morfológicos y cuantitativos (27), constituye uno de estos enfoques. Otra de las más recientes tecnologías utilizadas la constituye el empleo de marcadores moleculares para la evaluación y caracterización del germoplasma; en este sentido, los resultados alcanzados en este trabajo colocan al mejoramiento genético de este cultivo en Cuba en una posición de avanzada en el uso de estos enfoques novedosos.

La utilización de sondas heterólogas en el estudio de la diversidad citoplasmática confirma, a pesar del alto grado de conservación del genoma citoplasmático, la utilidad de estos marcadores para examinar las relaciones filogenéticas en especies poliploides. La demostración de la ocurrencia de diferenciación entre los géneros *Saccharum* y *Erianthus* a partir de materiales silvestres del germoplasma cubano apoya informes previos realizados en este cultivo (28, 29). Los citofondos específicos de *Erianthus* y *S. spontaneum* detectados en estos materiales ofrecen una fuente alternativa de citoplasma, que deben ser considerados para futuros trabajos de mejoramiento, en específico para la resistencia a estrés.

Marcadores más específicos como el polimorfismo del gen del ADN ribosomal 5S permiten complementar la identificación de este tipo de clones. La amplificación de estos genes en los clones evaluados en este trabajo presentó una distinción interespecífica entre *S. officinarum* y *S. spontaneum* con respecto a *E. arundinaceus* (21),

distinción enriquecida a partir de los resultados alcanzados en el presente trabajo con la inclusión de las especies *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense* y *E. sara*, *E. elegans* y clones silvestres de origen desconocido (clones ECL).

Estos resultados constituyen un punto de referencia para abordar la identificación más detallada de clones de caña de azúcar, mediante el empleo de marcadores moleculares de alto volumen entre los que se incluyen: los microsatélites, tecnología que supera a las aplicadas hasta el presente en cuanto al nivel de polimorfismo detectable (30, 31), y los AFLPs que han resultado de gran valor en estudios para la determinación de la diversidad genética y la identificación de varias especies de plantas (32, 33, 34), incluida la caña de azúcar (35).

CONCLUSIONES

El polimorfismo de ADN nuclear y citoplasmático revelado permitió determinar grupos en la colección evaluada en base a su diversidad genética, para asistir a su manejo en el programa de introgresión de la caña de azúcar.

Los resultados obtenidos permiten realizar una explotación más eficiente de los progenitores más promisorios, con el objetivo de transferir caracteres deseables, caracteres que están presentes en la especie silvestre *S. spontaneum*, en el género *Erianthus* y en los clones silvestres colectados (clones ECL).

Los resultados permitirán a los mejoradores utilizar fuentes citoplasmáticas alternativas, considerando además su comportamiento agronómico y la posibilidad de ser cruzados.

Los resultados confirmaron además la identificación como *Erianthus* spp., *Saccharum* spp. o posibles híbridos *Saccharum* x *Erianthus* de los clones silvestres colectados (ECL) y adicionalmente informar la distinción interespecífica entre las especies *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense* y *E. sara*, *E. elegans* y clones silvestres de origen desconocido.

REFERENCIAS

1. Berding, N. y Roach, B.T. Germplasm maintenance and use. En: Developments in Crop Science II. Sugarcane Improvement Through Breeding. New York:Elsevier, 1987. p. 143-210.
2. Deren, C.W. Genetic Base of U.S. Mainland Sugarcane. *Crop Sci.*, 1995, vol. 35, p. 1195-1199.
3. Hoarau, Y. J.; Offmann, B.; D'Hont, A.; Risterucci, A. M.; Roques, D.; Glaszmann, J. C. y Grivet, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. *Theor Appl. Genet.*, 2001, vol. 103, p. 84-97.
4. Prada, F. de. Estudio y utilización de los recursos genéticos de la caña de azúcar y formas relacionadas. [Tesis de grado], 1998.
5. Daniels, J. y Roach, B. T. Taxonomy and Evolution. En: Sugarcane Improvement Through Breeding New York:Elsevier, 1987. p. 7-84.

6. Besse, P. y McIntyre, L. Isolation of an *Erianthus* section *Ripidium* specific ribosomal DNA fragment and its usefulness for studying *Saccharum X Erianthus* introgression populations. En: Sugarcane: Research towards efficient and sustainable production. Brisbane : CSIRO, 1996. p. 61-63.
7. Glaszmann, J. C. y D'Hont, A. Análisis molecular de la biodiversidad del germoplasma en caña de azúcar. En: "Biodiversidad y Biotecnología de la caña de azúcar", La Habana: Elfos Scientiae, 1999.
8. Weising, K.; Winter, P.; Huttler, B. y Kshl, G. Microsatellite markers for molecular breeding. *Journal of Crop Production*, 1998, vol. 1, p. 113-142.
9. Cordeiro, G. Molecular Markers Systems for Sugarcane Germplasm Analysis. En *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*. London; CAB International, 2001.
10. Prada, F. de. Estudio y Utilización de los recursos genéticos de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.). [Tesis de grado]; INICA, 1998.
11. Prada, F. de; Pérez, G.; Tomeu, A. y Jorge, H. Establecimiento de una colección núcleo para el rendimiento agroazucarero y la resistencia a enfermedades. En: Estrategia y recomendaciones para la ampliación de la base genética del mejoramiento de la caña de azúcar en Cuba, 2000.
12. Hoisington, D. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico : CIMMYT, 1992.
13. Pérez, G.; Prada, F. de; Chinea, A.; Bernal, N. y O'Reilly, J. Recursos fitogenéticos de la caña de azúcar. La Habana: INICA, 1997. 249 p.
14. Alix, K.; Paulet, F.; Glaszmann, J. C. y D'Hont, A. Inter-Alu like species specific sequences in the *Saccharum* complex. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, vol. 99, p. 962-968.
15. Cornide, M. T.; Coto, O.; Calvo, D.; Canales, E.; Prada, F. de y Pérez, G. Molecular markers for the identification and assisted management of genetic resources for sugarcane breeding. *Plant Varieties and Seeds*, 2000, vol. 13, p. 113-123.
16. Dice, L. R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 1945, vol. 26, p. 297-302.
17. Nei, M. y Li, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, vol. 76, p. 5269-5273.
18. Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. 1973, p. 573.
19. D'Hont, A.; Ison, D.; Alix, K.; Roux, C. y Glaszmann, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of RNA genes. *Genome*, 1998, vol. 41, p. 221-225.
20. Coto, O.; Cornide, M. T.; Calvo, D.; Canales, E.; D'Hont, A. y Prada, F. de. Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with markers. *Euphytica*, 2002, vol. 123, p. 121-130.
21. D'Hont, A.; Rao, P. S.; Feldmann, P.; Grivet, L.; Islam-Faridi, N.; Taylor, P. y Glaszmann, J. C. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids *Saccharum officinarum x Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, vol. 91, p. 320-326.
22. Alix, K.; Paulet, F.; Glaszmann, J. C. y D'Hont, A. Isolation and characterization of a satellite DNA family in the *Saccharum* complex. *Genome*, 1998, vol. 41, p. 854-864.
23. Jannoo, N.; Grivet, L.; Seguin, M.; Paulet, F.; Domaingue, R.; Rao, P. S.; Dookun, A.; D'Hont, A. y Glaszmann, J. C. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, vol. 99, p. 171-184.
24. Marita, J. M.; Rodríguez, J. M. y Nienhuis, J. Development of an algorithm identifying diverse core collections. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, vol. 47, p. 515-526.
25. Liu, F.; Von Bothmer, R. y Salomon, B. Genetic diversity in European accessions of the Barley Core Collection as detected by isozyme. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, vol. 47, no. 6, p. 571-581.
26. Tullu, A.; Kusmenoglu, I.; McPhee, K. E. y Muehlbauer, F. J. Characterization of core collections of lentil germplasm phenology, morphology, seed and straw yields. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2001, vol. 48, no. 2, p. 143-152.
27. Balakrishnan, R.; Nair, N. V. y Sreenivasan, T. V. A method for establishing a core collection of *Saccharum officinarum* L. germplasm based on quantitative-morphological data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, vol. 47, no. 1, p. 1-9.
28. Sobral, B. W. S.; Braga, D. V. P.; La Hood, E. S. y Keim, P. Phylogenetic analysis of chloroplast restriction enzyme site mutations in the *Saccharinae* Griseb Subtribe of the Andropogoneae Dumont tribe. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, vol. 87, p. 843-853.
29. Al-Janabi, S. M.; McClelland, C.; Petersen, C. y Sobral, B. W. S. Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: *Saccharineae*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, vol. 88, p. 933-944.
30. Cordeiro, G. M.; Maguire, T. L.; Edwards, K. J. y Henry, R. J. Optimization of microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, vol. 17, p. 225-229.
31. Cordeiro, G. M.; Taylor, G. O. y Henry, R. J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) a highly polyploid species. *Plant Science*, 2000, vol. 155, p. 161-168.
32. Muluvi, G. M.; Sprent, J. L.; Soranzo, N.; Provan, J.; Odee, D.; Folkard, G.; McNicol, J. W. y Powell, W. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology*, 1999, vol. 8, p. 463-470.
33. Loh, J. P.; Kiew, R.; Hay, A.; Ke, A.; Gan, L. H. y Gan, Y. Y. Intergeneric and interspecific relationships in *Araceae* tribe *Caladieae* and development of molecular markers using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Annals of Botany*, 2000, vol. 85, p. 371-378.
34. Donini, P.; Cooke, R. J. y Reeves, J. C. Molecular Markers in Variety and Seed Testing. En: *Plant Genetic Engineering: Towards the Third Millennium*, New York : Elsevier Science, 2000.
35. Besse, P.; Taylor, G.; Carroll, B.; Berding, N.; Burner, D. y McIntyre, C. L. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. *Genetica*, 1998, vol. 104, p. 143-153.

Recibido: 7 de noviembre de 2003

Aceptado: 29 de julio de 2004