

Caracterización botánica de variedades de caña de azúcar mediante marcadores fenotípicos y moleculares

M Francisca Perera*, Diego D Costilla**, Natalia S Ovejero*, Matias Aybar Guchea**, M Fernanda Figueroa**, Aldo S Noguera*, María Inés Cuenya** y Atilio P Castagnaro*

RESUMEN

El Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar (PMGCA) de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) genera continuamente nuevas variedades de caña de azúcar, especialmente para la provincia de Tucumán, Argentina. Una precisa identificación varietal es esencial para proteger los derechos de propiedad intelectual de los nuevos cultivares. Para caracterizar tres cultivares de caña de azúcar recientemente liberados por el PMGCA, en este trabajo se utilizaron marcadores moleculares TRAP y SSR (de sus siglas en inglés de "Target Region Amplified Polymorphism" y "Simple Sequence Repeat", respectivamente), en combinación con marcadores fenotípicos propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). Se utilizaron cinco combinaciones de cebadores TRAP y cinco pares de cebadores SSR. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Para la caracterización fenotípica se utilizaron los nueve descriptores obligatorios de la UPOV. Las bandas y los datos morfológicos se transformaron en matrices binarias de 0 y 1, se calculó la similitud y se generaron los dendrogramas utilizando el análisis UPGMA (de sus siglas en inglés de "Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages"). Ambos marcadores moleculares revelaron claramente la relación filogenética entre genotipos. La caracterización morfológica permitió diferenciar correctamente las variedades analizadas, revelando únicamente la semejanza externa entre los genotipos. La caracterización completa permitió diferenciar inequívocamente los cultivares recientemente liberados para registrarlos y proteger los derechos de los mejoradores.

Palabras clave: descriptores de la UPOV, SSR, TRAP.

ABSTRACT

Botanical characterization of new sugarcane cultivars through molecular and phenotypical markers

The Sugarcane Breeding Program of Agroindustrial Experimental Station Obispo Colombres continuously generates new varieties of sugarcane, especially for the province of Tucumán, Argentina. Accurate varietal identification is essential to protect the intellectual property rights of new varieties. In this work, Target Region Amplified Polymorphism (TRAP) and Simple Sequence Repeat (SSR) molecular markers were used, in combination with phenotypic markers proposed by the International Union for Plant Variety Protection (UPOV), to characterize three sugarcane varieties recently released by the local breeding program. Five combinations of TRAP primers and five pairs of SSR primers were used. The amplification products were separated by electrophoresis in polyacrylamide gels under denaturing conditions. For the phenotypic characterization, the nine mandatory UPOV descriptors were used. The bands and morphological data were transformed into binary matrixes of 0 and 1, the similarity was calculated and the dendrograms were generated by the Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) analysis. Both molecular markers clearly revealed the phylogenetic relationship among genotypes. The morphological characterization correctly differentiated the varieties analyzed; only revealing the external similarity between genotypes. The entire characterization allowed us to unambiguously differentiate the recently released cultivars to register and protect plant breeder's rights.

Key words: SSR, TRAP, UPOV's descriptors.

Fecha de recepción: 26/06/2019 - Fecha de aceptación: 06/03/2020

Trabajo subsidiado por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

* Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Las Talitas, Tucumán, R. Argentina, T4101XAC.

* Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Las Talitas, Tucumán, R. Argentina, T4101XAC.

INTRODUCCIÓN

La identificación varietal precisa resulta esencial para proteger los derechos de propiedad intelectual de las nuevas variedades de caña de azúcar. Para este propósito, diversos conjuntos de datos tales como los provenientes de marcadores moleculares y fenotípicos empleados en simultáneo permiten lograr una identificación varietal más exacta. Los marcadores moleculares son herramientas muy valiosas para la identificación de germoplasma y para comprender la complejidad genética de la caña de azúcar, ya que son precisos, abundantes y no están afectados por el ambiente (D'Hont *et al.*, 1997). Entre ellos, los marcadores de repetición de secuencia simple (SSR) o microsatélites son uno de los más empleados en la caracterización de plantas (Cordeiro *et al.*, 2001), debido a su abundancia, sensibilidad y alta precisión en la detección de polimorfismo incluso entre genotipos estrechamente relacionados (Powell *et al.*, 1996). Por otro lado, los marcadores que se clasifican como funcionales, es decir que se dirigen a genes blanco tales como los TRAP (de sus siglas en inglés de "Target Region Amplified Polymorphism"), reflejan el polimorfismo funcional (Li and Quiros, 2001).

Los caracteres morfológicos resultan también de gran ayuda para la evaluación e identificación de recursos genéticos. En ese sentido, los descriptores propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2005) constituyen herramientas valiosas, dado que al ser adoptados internacionalmente permiten asegurar la identidad de variedades tanto dentro como entre programas de mejoramiento (Gallacher, 1997). Aunque en algunos casos los caracteres morfológicos pueden dar respuestas ambiguas al estar afectados por factores ambientales (García *et al.*, 2002), la UPOV propone descriptores muy estables. Entre los 54 caracteres morfológicos propuestos por la UPOV, nueve son obligatorios para identificar variedades de caña de azúcar: adherencia de la vaina de la hoja al tallo, diámetro y forma del entrenudo, color del entrenudo expuesto y no expuesto al sol, expresión de la alineación en zig-zag del tallo, forma de la yema excluyendo las alas, color del collar de la vaina de la hoja y ancho de la parte media de la hoja (Costilla *et al.*, 2011).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar inequívocamente tres variedades de caña de azúcar liberadas en el año 2019 por el Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar (PMGCA) de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC): TUC00-65, TUC02-22 y TUC06-7. Para ello, se emplearon marcadores moleculares TRAP y SSR y los descriptores obligatorios propuestos por la UPOV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos de caña de azúcar y extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó con el método de CTAB (Aljanabi *et al.*, 1999) a partir de 200 mg de hojas jóvenes molidas con nitrógeno líquido de 14 genotipos de caña de azúcar correspondientes a las tres variedades liberadas recientemente por el PMGCA y 11 variedades, entre las que se incluyen las más plantadas, otras en difusión y genotipos parentales (Tabla 1).

La concentración y la calidad del ADN se determinaron midiendo la densidad óptica a 260 nm en espec-

trofotómetro y mediante electroforesis en gel de agarosa (0,7% p/v), respectivamente.

Tabla 1. Genotipos de caña de azúcar analizados y sus correspondientes progenitores.

Genotipo	Progenitor	
	Femenino	Masculino
TUC00-65*	HOCP91-555	TUC72-16 (TUC89-20)
TUC06-7*	TUC89-32	LCP85-384
TUC02-22*	Desconocido**	Desconocido
LCP85-384*	CP77-310	CP77-407
TUC00-19	HOCP92-675	TUCCP77-42
TUC03-12	HOCP92-631	TUC72-16
TUC89-28*	TUCCP77-42	TUCCP77-42
TUC95-10	CP72-370	CP57-614
TUC95-24*	CP79-348	LCP85-358
TUC95-37*	CP65-357	S87-1756
TUC97-8*	TUC87-21	TUCCP77-42
TUCCP77-42*	CP71-321	US72-019
HOCP91-555	CP83-644	LCP82-94
TUC72-16	CP66-372	L65-69

*Genotipos caracterizados morfológicamente.

**La variedad TUC02-22 resultó de la evaluación y selección clonal de individuos originados de una mezcla de semilla botánica de varios cruzamientos, por lo que se desconocen sus progenitores.

Amplificación con marcadores TRAP

Las muestras de ADN se caracterizaron con cinco combinaciones de cebadores TRAP. Los cebadores fijos fueron diseñados por Alwala *et al.* (2006) a partir de genes asociados con el metabolismo de la sacarosa, y los cebadores antisentido arbitrarios se obtuvieron de Li and Quiros (2001). La mezcla de reacción, optimizada en nuestro laboratorio, contenía: 1 x tampón Taq ADN polimerasa; 2,5 mM de MgCl₂; 0,1 U de Taq ADN polimerasa; 0,16 mM de ambos cebadores (Invitrogen, Life Technologies); 88 mM de cada dATP, dTTP y dGTP; 72 mM de dCTP; 1,4 mM de Cy5.5-dCTP (GE Healthcare Life Sciences) y 100 ng de ADN. Los parámetros de amplificación fueron los siguientes: un ciclo a 94°C durante 4 min; 35 ciclos a 94°C durante 45 s; 50°C durante 45 s y 72°C durante 1 min; y un ciclo a 72°C durante 7 min.

Se utilizaron también cinco cebadores SSR para los estudios de caracterización genética (Perera *et al.*, 2012). La mezcla de reacción contenía: 1 x tampón; 88 mM de cada dATP, dTTP y dGTP; 72 mM de dCTP; 1,4 mM de Cy5.5-dCTP (GE Healthcare Life Sciences); 1,2 μM de cebadores; 2,5 mM de MgCl₂; 0,5 U de Taq ADN polimerasa y 10 ng de ADN. Los parámetros de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C durante 5 min; 30 ciclos a 94°C durante 45 s, temperatura y tiempo de hibridación apropiados y 72°C durante 1 min; y 1 ciclo a 72°C durante 3 min.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en un analizador de ADN (LI-COR DNA Analyzer 4300). Los geles se analizaron utilizando el software SagaMX AFLP (LI-COR).

Caracterización morfológica

De los 14 genotipos de caña de azúcar analizados molecularmente, solo nueve se caracterizaron morfológicamente de acuerdo a la disponibilidad de material vegetal en condiciones para la caracterización (Tabla 1). Se describieron plantas de 10 a 12 meses de edad utilizando los nueve caracteres obligatorios propuestos por la UPOV (2005) para caña de azúcar: adherencia de la vaina de la hoja al tallo, diámetro y forma del entrenudo, color del entrenudo expuesto y no expuesto al sol, expresión de la alineación en zig-zag del tallo, forma de la yema excluyendo las alas, color del collar de la vaina de la hoja y ancho de la parte media de la hoja. Las observaciones de los caracteres cualitativos se efectuaron sobre seis cañas como mínimo, o sobre partes de cada una de ellas, y para la evaluación de los caracteres cuantitativos (diámetro del entrenudo y ancho de la parte media de la hoja), se utilizaron más de 24 cañas o partes de cada una de ellas, todas procedentes de distintas cepas en campo durante el primer ciclo de crecimiento de estas (edad de caña planta).

Análisis de datos

Cada marcador molecular y morfológico se transformó en una matriz binaria de 0 y 1. La similitud se calculó utilizando el coeficiente de Jaccard (Sj) (Sneath and Sokal, 1973). Los análisis de conglomerados se llevaron a cabo utilizando el análisis de similitud de McQuitty (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973). El módulo FIND se utilizó para identificar todos los árboles que fueron compilados por el módulo CONSEN para validar la robustez de la topología de los árboles. Todos los cálculos se realizaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009).

Para determinar el nivel de correlación entre la matriz de similitud genética obtenida de SSR y TRAP, y entre la matriz de distancia que reúne los datos de los dos marcadores moleculares y los datos morfológicos, se utilizó la prueba de Mantel (Dutilleul *et al.*, 2000).

RESULTADOS

Al amplificar las 14 muestras con las cinco combinaciones de cebadores TRAP se generó un total de 192 fragmentos con 38 bandas en promedio por combinación y un promedio de 61% de polimorfismo (Tabla 2). Cuando se construyó el dendrograma empleando el coeficiente de Jaccard, las similitudes genéticas variaron entre 0,73 y 0,88.

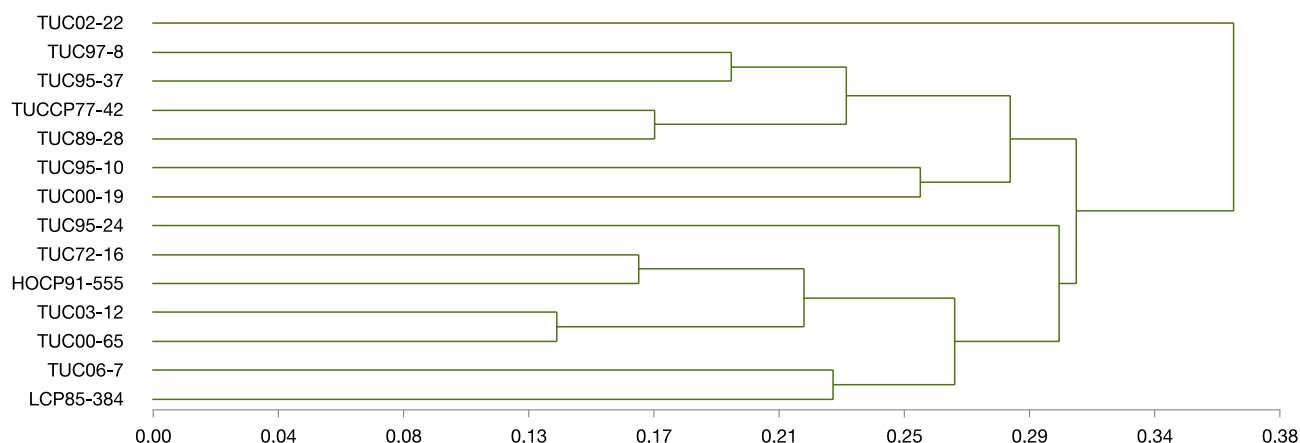


Figura 1. Dendrograma de 14 genotipos de caña de azúcar basado en el análisis de marcadores TRAP y SSR utilizando el coeficiente de Jaccard y el método de agrupación UPGMA con InfoStat, presentado como distancia (1-S, S: similitud).

Tabla 2. Fragmentos totales y porcentaje de polimorfismo obtenido para cada combinación de cebadores TRAP empleada en este estudio.

Cebador fijo	Cebador arbitrario	Fragmentos totales	Polimorfismo (%)
SuPS1	Arbi 3	26	50
DirH	Arbi 2	50	72
	Arbi 3	44	66
Sut4	Arbi 2	38	55
	Arbi 3	34	56
Total		192	61

Cuando las muestras se amplificaron con los cinco pares de cebadores SSR, se generó un total de 45 fragmentos y los valores de PIC (contenido de información polimórfica) oscilaron entre 0,20 y 0,33 (Tabla 3). Las similitudes genéticas calculadas con el coeficiente de Jaccard oscilaron entre 0,45 y 0,82.

Tabla 3. Características de los pares de cebadores SSR empleados.

Cebador	Motivo repetido	Temp. de hibridación (°C)	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	PIC	Obtenidos de
222	(CA) ₂₄	62	10	7	0,31	Cordeiro <i>et al.</i> (2000)
226	(CA) ₁₀	60	9	6	0,20	
863	(TC) ₉	55	7	3	0,27	
19	(GA) ₂₃	52	9	9	0,33	D'Hont (sin publicar)
27	(GA) ₁₈	56	10	9	0,28	

Considerando que se obtuvo una correlación de Mantel de 0,86 y estadísticamente significativa entre las matrices de distancia de TRAP y SSR (p: 0,045), los datos de ambos marcadores moleculares se analizaron juntos. En el dendrograma obtenido, las similitudes genéticas variaron entre 0,64 y 0,87 utilizando el coeficiente de Jaccard (Figura 1). Este árbol reflejó el pedigrí de los genotipos, porque la variedad TUC89-28 se obtuvo mediante autofecundación de la TUCCP77-42, y ambas se agruparon compartiendo 83% de similitud. Además, TUCCP77-42 es el progenitor masculino de TUC97-8 y TUC00-19 y coin-

cidieron en un grupo donde la similitud fue 77% y 72%, respectivamente. Igualmente, LCP85-384 es el progenitor masculino de TUC06-7 y se agruparon y compartieron 77% de similitud.

Por otro lado, la variedad TUC00-65 se obtuvo en una policruza con HOC91-555 como progenitor femenino, y TUC72-16 o TUC89-20 como progenitores masculinos. En el dendrograma, TUC00-65 compartió 87% de similitud con TUC03-12 (cuyo progenitor masculino es TUC72-16) y ambas se agruparon con HOC91-555 y TUC72-16 (78% de similitud). Teniendo en cuenta esta información, es posible inferir que el progenitor masculino de TUC00-65 es TUC72-16, aun en ausencia de la caracterización del otro progenitor debido a la no disponibilidad de material vegetal para realizar los análisis.

La variedad TUC02-22 comparte solo 64% de similitud con el resto de las variedades analizadas. De esta variedad se desconocen los progenitores, dado que se obtuvo de la evaluación y selección clonal de individuos originados de una mezcla de semilla botánica de varios cruzamientos.

DISCUSIÓN

Una identificación más precisa de los genotipos de caña de azúcar se puede lograr empleando una combinación de marcadores morfológicos y moleculares. En el caso del presente estudio, los marcadores TRAP y SSR fueron útiles para la identificación genotípica y para establecer relaciones entre los diferentes genotipos de caña de azúcar, revelando la información de pedigrí, como se describió anteriormente con marcadores SSR (Cordeiro *et al.*, 2001). Aun más, fueron útiles para inferir qué progenitor masculino estaba involucrado en un policruzamiento.

Los valores de PIC obtenidos por los marcadores SSR reflejan el nivel de diversidad capturado en la caña de azúcar cultivada. El rango de valores de PIC obtenidos (0,20 a 0,33) fue similar al obtenido anteriormente cuando se caracterizaron 36 genotipos de caña de azúcar, utilizando 15 pares de cebadores SSR, incluidos los utilizados en el presente estudio (0,18 a 0,32) (Perera *et al.*, 2012). Merece destacarse que a pesar de que cuatro de los genotipos se caracterizaron en ambos estudios, gran parte (23/36) de las variedades analizadas por Perera *et al.* (2012) corres-

ponde a otros programas de mejoramiento, diferentes al de la EEAOC.

En relación a las tres variedades recientemente liberadas al ser caracterizadas con los marcadores moleculares, se observó que TUC06-7 compartió el mayor porcentaje de similitud con su progenitor masculino (el otro no fue caracterizado); en el caso de TUC00-65 presentó mayor similitud con otra variedad de reciente liberación también (TUC03-12) con la que comparte el progenitor masculino, mientras que la tercera variedad es la más diferente de todas las caracterizadas. Respecto a la caracterización morfológica, todas las variedades resultaron fácilmente diferenciables, ya que las dos que mayor similitud compartieron son TUC00-65 y TUC02-22 (62%).

De acuerdo a lo mencionado previamente, los caracteres morfológicos propuestos por UPOV (2005) fueron más discriminantes que los marcadores TRAP y SSR, dado que revelaron más diferencias entre los genotipos. Lo mismo fue detectado previamente por Salem *et al.* (2008) utilizando SSR, y por Perera *et al.* (2012) con marcadores AFLP y SSR. Los nueve caracteres propuestos por la UPOV y considerados obligatorios para identificar genotipos de caña de azúcar distinguieron eficientemente las variedades. Sin embargo, los caracteres morfológicos por sí solos pueden ser inadecuados para evaluar correctamente la relación filogenética entre los genotipos, dado que solo revelaron la semejanza externa.

CONCLUSIONES

La caracterización completa, incluyendo los datos moleculares y morfológicos, permitió diferenciar inequívocamente las tres variedades recientemente liberadas por el PMGCA de la EEAOC para registrar y proteger los derechos del obtentor. Ambos marcadores moleculares, TRAP y SSR, revelaron claramente la relación filogenética entre los genotipos.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aljanabi, S.; L. Forget and A. Dookun. 1999. An improve and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol free sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 281.

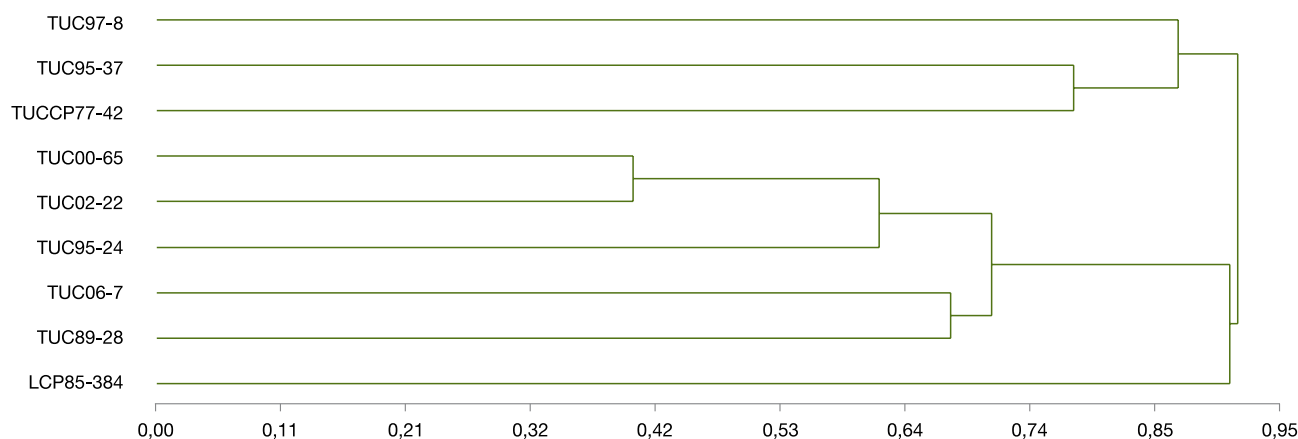


Figura 2. Dendrograma de nueve genotipos de caña de azúcar basado en el análisis de nueve caracteres obligatorios propuestos por la UPOV, construido con el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA con InfoStat, presentado como distancia (1-S, S: similitud).

- Alwala, S.; A. Suman; J. A. Arro; J. C. Veremis and C. A. Kimbeng. 2006.** Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germoplasm collections. *Crop Sci.* 46: 448-455.
- Cordeiro, G. M.; R. Casu; C. L. McIntyre; J. M. Manners and R. J. Henry. 2001.** Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *Erianthus* and *Sorghum*. *Plant Sci.* 160: 1115-1123.
- Cordeiro, G. M.; G. O. Taylor and R. J. Henry. 2000.** Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. *Plant Sci.* 155: 161-168.
- Costilla, D. D.; E. R. Chavanne; M. I. Cuenya.; M. B. García y M. Arias. 2011.** Descripción y registro de variedades de caña de azúcar producidas y difundidas por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. *Avance Agroind.* 32 (1): 8-12.
- D'Hont, A.; P. Seshagiri Rao; S. Alleyne; J. C. Glaszmann and P. Feldmann. 1997.** Application of molecular markers in sugarcane breeding. *Proceedings West Indies sugar technologists*, pp. 77-79.
- Di Rienzo, J.; F. Casanoves; M. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada y C. Robledo. 2009.** InfoStat. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dutilleul, P.; J. D. Stockwell; D. Frigon and P. Legendre. 2000.** The Mantel Test versus Pearson's correlation analysis: assessment of the differences for biological and environmental studies. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 5 (2): 131-150.
- Gallacher, D. J. 1997.** Optimised descriptors recommended for Australian sugarcane germplasm (*Saccharum* spp. Hybrid). *Aust J Agric Res.* 48 (6): 775-779.
- García, M. G.; M. Ontivero; J. C. Díaz Ricci and A. P. Castagnaro. 2002.** Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. *Plant Breed.* 121: 76-80.
- Li, G. and C. F. Quiros. 2001.** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *TAG.* 103: 455-461.
- Perera, M.; M. Arias; D. Costilla; A. C. Luque; M. B. García; M. I. Cuenya; J. Racedo; S. Ostengo; M. P. Filippone and A. P. Castagnaro. 2012.** Genetic diversity assessment and genotype identification in sugarcane based on DNA markers and morphological traits. *Euphytica.* 185: 491-510. DOI: 10.1007/s10681-012-0661-9. 185 (3):491-510.
- Powell, W.; G. Machray and J. Provan. 1996.** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1: 215-222.
- Salem, K. F. M.; A. M. El-Zanaty and R. M. Esmail. 2008.** Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatellite markers. *World J. of Agric. Sci.* 4: 538-544.
- Sneath, P. H. and R. R. Sokal. 1973.** Numerical taxonomy: the principles and practices of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2005.** Directrices para la ejecución del examen de distinción, homogeneidad y estabilidad tg/186/1. www.Upov.Int/es/publications/tg-rom/tg186/tg_186_1.Pdf (accessed 1 April 2019).