

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

“UTILIZACIÓN DE MARCADORES DE ADN POLIMÓRFICOS AMPLIFICADOS
AL AZAR (RAPD) PARA LA DETECCIÓN DE VARIACIÓN GENÉTICA EN 39
GENOTIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp*)”

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

LUIS FELIPE LEÓN SOLARES

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, FEBRERO DE 2,000

DL
01
+ (1962)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO

VOCAL PRIMERO

VOCAL SEGUNDO

VOCAL TERCERO

VOCAL CUARTO

VOCAL QUINTO

Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera

Ing. Agr. Walter Estuardo García Tello

Ing. Agr. William Roberto Escobar López

Ing. Agr. Alejandro Arnoldo Hernández Figueroa

MPU. Jacobo Bolvito Ramos

Br. José Baldomero Sandoval Arriaza

Guatemala, febrero de 2,000.

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Respetables señores:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

“ UTILIZACIÓN DE MARCADORES DE ADN POLIMÓRFICOS AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD) PARA LA DETECCIÓN DE VARIACIÓN GENÉTICA EN 39 GENOTIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*)”.

Trabajo que presento como requisito previo a optar por el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado Académico de Licenciado.

A espera de una resolución favorable me suscribo de ustedes.

Luis Felipe León Solares.

Tesis que dedico a:

Los pilares de mi historia personal; los presentes y ausentes. Ustedes que han formado y forman la realidad de mi vida; una pequeña chispa iluminada por tan grandes luces:

Mis Padres,

María Isabel Solares Alvizúres de León

José Arturo León Castillo,

Mi familia y

Mis amigos.

RECONOCIMIENTO:

Al Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA) y Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC). Instituciones pioneras en la investigación agrícola nacional, las cuales avalaron y apoyaron desde su concepción este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que hicieron posible esta investigación:

- Ph. D. Gregorio Jacobo Soto Guevara (QEPD) por su confianza, apoyo y perseverancia para hacer realidad la ciencia en Guatemala.
- Ing. Agr. Msc. Domingo Amador Pérez y Ph. D. César Augusto Azurdía Pérez, asesores cuyo entusiasmo y colaboración hizo de este un trabajo dinámico y tangible.
- Ph. D. Mario Francisco Melgar Morales, director general de CENGICAÑA, por su gran interés y apoyo para el desarrollo de la biotecnología y en especial para la realización de este trabajo.
- Ing. Agr. Rioko Hirano e Ing. Agr. Amilcar Sánchez, encargados del Laboratorio de Biotecnología de la FAUSAC, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.
- Ing. Agr. Msc. Werner Ovalle y Ph. D. José Luis Quemé De León, de CENGICAÑA, Ph. D. Julie M. Rodríguez, de la Universidad Autónoma de Guadalajara, Ph. D. Luis Mejía De León, Ph. D. Ariel Ortiz y Ph. D. Carlos Orozco, de la FAUSAC, por sus valiosos aportes, los cuales enriquecieron el trabajo.
- Ph. D. alvaro Molina y Lic. Margarita Palmieri, de la Universidad del Valle de Guatemala, Lic. Maria Eugenia Paredes, Lic. María Paula De León, lic. Carlota Monroy y Lic. Juan J. Chávez de la Facultad de Farmacia por su incondicional colaboración.
- Todo el personal de CENGICAÑA, por la colaboración que brindaron en el desarrollo de todas las fases de la investigación, en especial a Priscila López, Mirna Ligia Aquirre, Oscar Guzmán, Rony Godínez, Ernesto Linares y Estuardo Catalán.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE ANEXOS	iii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. JUSTIFICACIÓN	2
4. MARCO TEÓRICO	3
4.1 MARCO CONCEPTUAL	3
4.1.1 LA CAÑA DE AZÚCAR	3
4.1.1.1 Taxonomía	3
4.1.1.2 Variabilidad genética	3
4.1.2 SÍNTESIS Y DUPLICACIÓN DEL ADN	4
4.1.2.1 Elementos importantes en la síntesis y duplicación del ADN	5
4.1.2.2 Procesos de duplicación	7
4.1.3 BIOSISTEMÁTICA Y MARCADORES MOLECULARES	8
4.1.3.1 Extracción de ADN genómico de plantas	9
4.1.3.2 Técnica de polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	10
4.1.3.3 Técnica de polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (AFLP)	10
4.1.3.4 Técnica del ADN polimórfico amplificado al azar	11
4.1.3.5 Ventajas de la técnica RAPD para el análisis de variabilidad genética	12

4.2 MARCO REFERENCIAL	17
4.2.1 UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN CAÑA DE AZÚCAR	17
4.2.2 DETECCIÓN DE LA VARIABILIDAD EN CAÑA Y OTRAS ESPECIES UTILIZANDO MARCADORES RAPDs	18
4.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL VEGETAL	20
5. OBJETIVOS	22
5.1 GENERAL	22
5.2 ESPECÍFICOS	22
6. HIPÓTESIS	22
7. METODOLOGÍA	23
7.1 FUENTE DEL MATERIAL VEGETAL	23
7.2 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE LOS CULTIVARES DE CAÑA EN ESTUDIO	23
7.3 PROCEDIMIENTO PARA LIMPIAR EL ADN DE CONTAMINANTES, VERIFICACIÓN DE PUREZA E INTEGRIDAD	24
7.4 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	25
7.5 DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FRAGMENTOS RAPD	25
7.5.1 VARIABLES EN ESTUDIO	26
7.6 EVALUACIÓN DEL GRADO DE SIMILITUD ENTRE INDIVIDUOS DE UNA MISMA POBLACIÓN	26
7.7 OBTENCIÓN DE LA DISTANCIA GENÉTICA ENTRE INDIVIDUOS DE UNA MISMA POBLACIÓN	27
7.8 COMPARACIONES ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DETECTADA CON RAPDs Y LA GENEALOGÍA	28

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
8.1 SELECCIÓN DE INICIADORES	28
8.2 DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS FRAGMENTOS RAPDs	29
8.3 EVALUACIÓN DEL GRADO DE SIMILITUD ENTRE CLONES	36
8.4 OBTENCIÓN DE LA DISTANCIA GENÉTICA ENTRE CLONES	39
8.5 COMPARACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DETECTADA CON RAPDs Y LA GENEALOGÍA	43
9. CONCLUSIONES	45
10. RECOMENDACIONES	46
11. BIBLIOGRAFÍA	47
12. ANEXOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Página
1. Ilustración del proceso de síntesis del ADN	6
2. Ilustración del proceso de duplicación del ADN	7
3. Ilustración del proceso de PCR	13
4. Ilustración del proceso de los RAPDs	14
5. Fenograma utilizando el método de ligamiento promedio con la información obtenida con los iniciadores OPA-4, OPB-11 y OPB-7 en donde se describe la variabilidad de una población de 39 materiales de caña de azúcar	30
6. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPAC-5 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar	32
7. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPA-1 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar	32
8. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPAC-1 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar	33
9. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPB-1 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar	33
10. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPB-5 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar	34
11. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPB-7 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar	34
12. Fenograma generado a partir de matriz de distancias utilizando el método de ligamiento promedio el cual indica la distancia relativa promedio entre los grupos formados	40

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Página
1. Comparación de la variabilidad que puede detectarse con RAPDs en distintas especies	19
2. Número de fragmentos polimórficos por iniciador	35
3. Promedio de similitudes entre variedades	37
4. Estadísticas generadas de los valores de similitud	38
5. Descripción de la agrupación de las variedades según el análisis de conglomerados indicando los siete grupos y con las variedades que estos incluyen	42
6. Coincidencias entre el análisis según marcadores fenotípicos y marcadores RAPDs indicando los distintos grupos en que se separan las variedades	43

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Página
1. Comparación entre algunos marcadores genéticos	16
2. Descripción de los grupos formados según análisis de componentes principales	21
3. Secuencia de bases nitrogenadas de los oligonucleótidos iniciadores de Operon Technologies utilizados para rastrear el polimorfismo de una población de 39 clones de caña de azúcar.....	31
4. Ancestros de los cuales se originan las 39 variedades en estudio	44

ÍNDICE DE ANEXOS

No.	Página
1. Agrupación de 144 variedades según análisis cluster respecto a variables fenotípicas ..	50
2. Listado de las 39 variedades incluidas en el estudio	51
3. Evaluación fenotípica de algunos de los 39 clones durante 4 zafras consecutivas a partir de 1993	52
4. Matriz de presencia (1) y ausencia (0) de las bandas generadas por cada uno de los marcadores en cada una de las 39 variedades, en la cual se muestra la distancia recorrido por los fragmentos de ADN y su respectivo peso molecular	54
5. Matriz de similitudes en la cual se toman en cuenta todas las comparaciones posibles entre variedades	57
6. Matriz de distancias en la cual se toman en cuenta todas las posibles comparaciones entre variedades	60
7. Árbol genealógico de las variedades CP 65357 y B 76385 que representan a las variedades más alejadas con un índice de similitud de 33.33%.....	63
8. Árbol genealógico de las variedades CP 5459 y JA 605 que representan a las variedades más cercanas con un índice de similitud de 92.68%.....	64
9. Árbol genealógico de las variedades CB 4013 CB 4513 las cuales proceden de los mismos padres y presentan un índice de similitud de 90.2%.....	64

**“UTILIZACIÓN DE MARCADORES DE ADN POLIMÓRFICOS AMPLIFICADOS
AL AZAR (RAPD) PARA LA DETECCIÓN DE VARIACIÓN GENÉTICA EN 39
GENOTIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*)”**

**“USE OF RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) MARKER TO DETECT
GENETIC VARIABILITY AMONG 39 SUGARCANE (*Saccharum spp.*) VARIETIES”**

RESUMEN

Con el objeto de incrementar los productos heteróticos o de encontrar variabilidad combinatoria, en un programa de mejoramiento es necesario conocer cuan similares son los genotipos de los progenitores. Para conocer esto los genetistas se han valido de descriptores con los cuales se puede caracterizar y categorizar a una población, dichos descriptores están basados en marcadores tanto fenotípicos (grados brix, altura, isoenzimas, etc.) como aquellos obtenidos directamente del ADN, estos últimos denominados marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares más ampliamente usados son los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) y AFLP (Amplified Fragment Length

Polymorphisms). Los marcadores RAPD han sido utilizados exitosamente para medir las relaciones genéticas de algunas especies cultivadas como la caña de azúcar.

Siendo la técnica RAPD apropiada para poder detectar la variabilidad que existe en el genoma de la caña de azúcar, utilizando esta técnica, se analizaron 39 variedades comerciales de caña de azúcar con el objeto de medir la similitud genética que existe entre ellos.

Para extraer el ADN se utilizó la metodología descrita por Dellaporta (14). Las condiciones para la amplificación y la metodología para la detección de los fragmentos producto de PCR fueron conducidas según lo describen Harvey *et al* (19). Utilizando 3 variedades contrastantes se evaluaron 48 iniciadores de 10 bases de la compañía comercial Operon Thecnologies, Inc. De estos se escogió solamente a los iniciadores AC-5, AC-1, B-7, AB-11, C-19, AB-5, B-1, A-1, D3, C-13, B-19 Y B-11.

La similitud genética se midió utilizando el índice de Dice (37), el cual toma en cuenta solamente las coincidencias positivas y las expresa como una medida relativa en forma de porcentaje. Las variedades presentaron un promedio general de similitud de 75.6%, un rango de similitud que va desde 27.59% (entre las variedades CP 65357 y MEX 69290) a 93.88% (entre las variedades B 4363 y CB 4035). Al obtener el promedio de similitud de cada variedad con todas las demás, el valor más bajo lo mostró la variedad CP 65357 (40.57%), siendo de esta manera la variedad más distinta a todas las demás. Al comparar estos resultados con la genealogía de estas variedades se encuentra gran coincidencia, siendo las variedades más emparentadas las más parecidas y viceversa. A pesar de esta tendencia, puede observarse algunas excepciones.

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar por ser la principal fuente de sacarosa se encuentra entre los cultivos más importantes a nivel mundial, consumiéndose durante el año 1,999 128.1 millones de toneladas de azúcar. Ese mismo año en Guatemala se produjo 1.56 millones de toneladas, de las cuales 0.45 millones (29% de la producción total) se destinaron al consumo interno y 1.11 millones (71%) a la exportación. La exportación de azúcar y melaza representó el 7.90% de las exportaciones totales del país generando 3,361,987.5 millones de dólares. La contribución al producto interno bruto de la producción azucarera total fue de 3% (4). No obstante la importancia de este producto, debido a las condiciones del mercado internacional y a las variaciones en el precio, la industria azucarera guatemalteca para poder ser competitiva, se ve obligada a aumentar la eficiencia en sus sistemas de producción.

Entre otras prácticas y técnicas, el mejoramiento genético es un factor determinante para aumentar la eficiencia de un cultivo al ir incorporando características favorables y eliminando las menos deseables, lo cual se consigue al manipular la variabilidad ya existente. Es en este marco que la precisa identificación genotípica de los cultivares de caña de azúcar se convierte en una tarea imprescindible, pues hace más eficientes los procesos de mejoramiento genético, al poder identificar en un menor tiempo, progenitores genéticamente contrastantes con los cuales se pueda obtener un mayor nivel de heterosis o una mayor variabilidad combinatoria.

El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA) realizó en 1,997 una caracterización fenotípica de 144 clones pertenecientes a la colección nacional. Con esta información se clasificaron las variedades en 14 grupos distintos según un análisis de conglomerados y 6 según análisis de componentes principales. Para ampliar la información obtenida con este estudio y para conocer con más detalle la variabilidad genética existente en la colección nacional de caña de azúcar, CENGICAÑA conjuntamente con la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos (FAUSAC), realizó una evaluación de 39 clones (escogidos entre los 14 y 6 grupos anteriores) utilizando los marcadores RAPDs (Random amplified polymorphic DNA segments).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gran parte del éxito de cualquier programa de mejoramiento depende del conocimiento de la variabilidad genética de los materiales con que se cuenta para poder realizar una planificación adecuada de las combinaciones de parentales en las hibridaciones.

La caracterización fenotípica es necesaria para detectar la variabilidad que existe en una población y para conocer el comportamiento de ciertos caracteres de interés en interacción con el factor ambiental, sin embargo con este tipo de caracterizaciones sólo es posible detectar una fracción pequeña de la variabilidad total. Si a lo anterior se suma la naturaleza poliploide de la caña de azúcar y posible inestabilidad de algunos de sus fenotipos, detectar esa pequeña fracción de variabilidad se convierte en una difícil tarea en términos de tiempo y costo.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente algunas de las dificultades a las que se enfrentan los métodos convencionales para detectar la variabilidad genética pueden ser solucionadas utilizando métodos basados en el ADN, pues estos detectan una mayor fracción de la variabilidad genética total de una población en un tiempo más corto.

Los métodos basados en los marcadores fenotípicos magnifican su utilidad cuando son complementados con la información obtenida a partir de los métodos basados en el ADN. De esta manera se amplía el conocimiento de la variabilidad y se hace más eficiente el proceso de mejoramiento, ahorrando tiempo y recursos.

El método de los marcadores basados en ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, por sus siglas en inglés) por su capacidad para detectar polimorfismo, ha resultado eficiente en el estudio de poblaciones y relaciones filogenéticas. Es por ello que se le utilizará para detectar la variabilidad existente en los 39 clones que incluye este trabajo y así complementar la información acerca de la variabilidad de estos, lo cual contribuirá a aumentar la eficiencia del programa de mejoramiento de la caña de azúcar en Guatemala.

4. MARCO TEORICO

4.1 MARCO CONCEPTUAL

4.1.1 LA CAÑA DE AZÚCAR

4.1.1.1 Taxonomía

Según el sistema filogenético de clasificación desarrollado por Cronquist(7) la sistemática de la caña es la siguiente:

REINO	Plantae
PHYLUM	Tracheophyta
SUBPHYLUM	Pteropsida
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Liliopsida
SUBCLASE	Commelinidae
ORDEN	Cyperales
FAMILIA	Poaceae
TRIBU	Andropogoneae
GENERO	Saccharum
ESPECIE	Saccharum ssp.

La caña de azúcar como cultivo se originó con *S. officinarum*, trabajos posteriores de mejoramiento y selección llevaron a la utilización de híbridos interespecíficos de *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. edule* y *S. barberi*.(8)

4.1.1.2 Variabilidad genética

La caña de azúcar está incluida en el género *Saccharum*, el cual incluye seis especies distintas con capacidad de cruzamiento interespecífico. El denominado “complejo *Saccharum*” incluye a los géneros

Saccharum, *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* y *Narenga*; estos constituyen un grupo de entrecruzamiento estrechamente relacionado (12) (8).

Además de la gran capacidad de producir cruces híbridos interespecíficos e intergénero, el género *Saccharum* presenta un gran rango de ploidía, siendo todas las seis especies poliploides (27).

- *S. ofinarum*: $2n=80$
- *S. spontaneum*: $2n= 40$ a 128
- *S. robustum*: $2n= 60$ ú 80
- *S. barberi*: $2n=81$ a 124
- *S. sinense*: $2n=111$ a 120

Según estimaciones realizadas se piensa que el número cromosómico básico en *Saccharum* es de $x= 5,6,8,10$ o 12 (28).

4.1.2 SÍNTESIS Y DUPLICACIÓN DEL ADN

El ADN es el responsable de mantener la continuidad de la vida. Es decir de generar nuevos entes vivientes a partir del que lo porta. Para cumplir con esta función, el ADN necesariamente debe duplicarse.

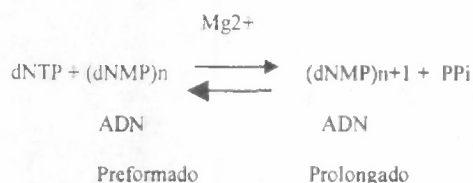
El proceso de duplicación es análogo al proceso de transcripción. La doble hélice se separa, permitiendo que las bases nitrogenadas queden con un extremo libre. A partir de cada hebra de la hélice se formará una hebra complementaria originando así dos hélices de ADN.

En la síntesis de ADN se necesita la presencia de: una plantilla de ADN constituido de una sola hebra, enzimas polimerasas, nucleótidos libres y Mg^{2+} .

4.1.2.1 Elementos importantes en la síntesis y duplicación del ADN

La síntesis del ADN es uno de los procesos bioquímicos más complejos de la célula viva, en el cual se involucran una gran cantidad de proteínas diferentes que todavía no se conocen. De las proteínas que intervienen en la catálisis durante las reacciones de síntesis de ADN se encuentran las ADN polimerasas, un conjunto de enzimas que hacen posible la adición de los nucleótidos específicos de acuerdo a una plantilla de ADN preformada (25). Hasta el momento se tiene conocimiento de las polimerasas I, II y III; numeradas así según el orden en que se purificaron y estudiaron.

La polimerasa I es capaz de catalizar la adición de residuos desoxirribonucleotídicos al extremo de una hebra de ADN cuando se le suministra ADN preformado, desoxiadenín trifosfato (-dATP), desoxiguanidín trifosfato (-dGTP), desoxicitocín trifosfato (-dCTP) y desoxitimidín trifosfato (-dTTP) (25). Teniendo una reacción global de la siguiente manera:



El ADN preformado sirve como molde y como iniciador en las reacciones en las cuales intervienen las polimerasas. Si éste no está presente, no se da la reacción.

La síntesis de ADN sigue la dirección de su extremo 5' al 3'. El grupo 3'-hidroxilo del residuo mononucleotídico terminal del extremo en crecimiento del ADN ataca al átomo de fósforo α electrofílico del nucleósido 5'-trifosfato que llega, provocando el desplazamiento del grupo pirofosfato que se libera y la formación del enlace fosfodiéster. La ADN polimerasa I tiene la capacidad de incorporar unos 1,000 residuos nucleotídicos por minuto y por molécula de enzima a 37°C (25).

La síntesis de ADN se lleva a cabo de la misma manera para cualquier tipo de ADN, sea cual sea su origen. Todas estas reacciones se comprobaron utilizando una sola hebra de ADN y fuera de una célula viva. Sin embargo, se comprobó que el ADN duplohelicoidal nativo e intacto presente en las células vivas no favorece la síntesis, a menos que exista una hebra mellada (un espacio nucleotídico entre un grupo 3'-hidroxilo libre y otro 5'-fostato libre, situados en restos adyacentes), ADNs dúplex que poseen una brecha (más de un espacio nucleotídico libre) en una de sus hebras.

Los requerimientos específicos de secciones de ADN dañado ponen de manifiesto que la polimerasa I cumple un papel de exonucleasa-ligasa más que de sintasa. Por tanto se hace necesario que existan otras polimerasas que cumplan con el papel principal de síntesis.

La polimerasa II presenta una actividad de exonucleasa 3' → 5' pero carece de actividad 5' → 3'. Esta enzima es efectiva con ADN dúplex que contenga brechas o extremos monofilares de 100 nucleótidos. Además esta no puede replicar largas monohebras que contengan cebadores complementarios cortos. La polimerasa III es la más activa en el proceso de polimerización. La figura 1 ilustra el proceso de síntesis del ADN.

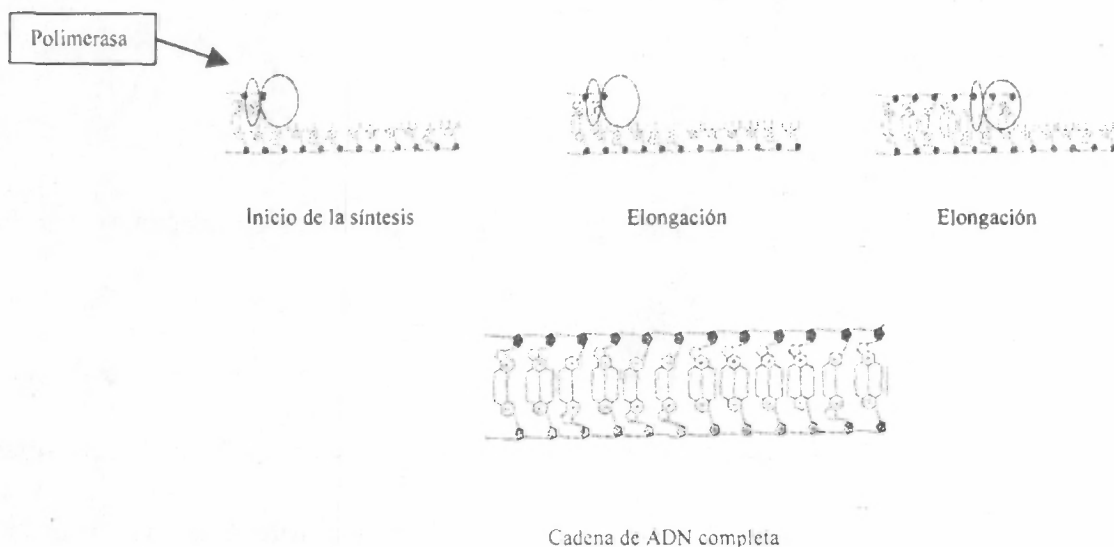


Figura 1. Ilustración del proceso de Síntesis del ADN.

4.1.2.2 Procesos de duplicación

Para que el proceso de síntesis pueda darse, las polimerasas deben contar con hebras monofilares de ADN. Ya que el ADN después de su duplicación permanece intacto, éste debe sufrir transformaciones reversibles. La primera modificación es provocar la abertura de la doble hélice, proceso que se da gracias a las proteínas desenrolladoras. Las proteínas desenrolladoras se unen fuertemente al ADN monofilar y débilmente a la doble hélice. En general el proceso de desenrollamiento del ADN es como sigue (figura 2):

- i. formación de una ruptura entre las hebras. Éste puede ser provocado por un efecto térmico local.
- ii. Las proteínas desenrolladoras se unen a las hebras en la ruptura y se estabiliza la abertura.
- iii. Las proteínas desenrolladoras se unen cooperativamente entre sí y haciendo más fuerte la unión entre las proteínas y el ADN.

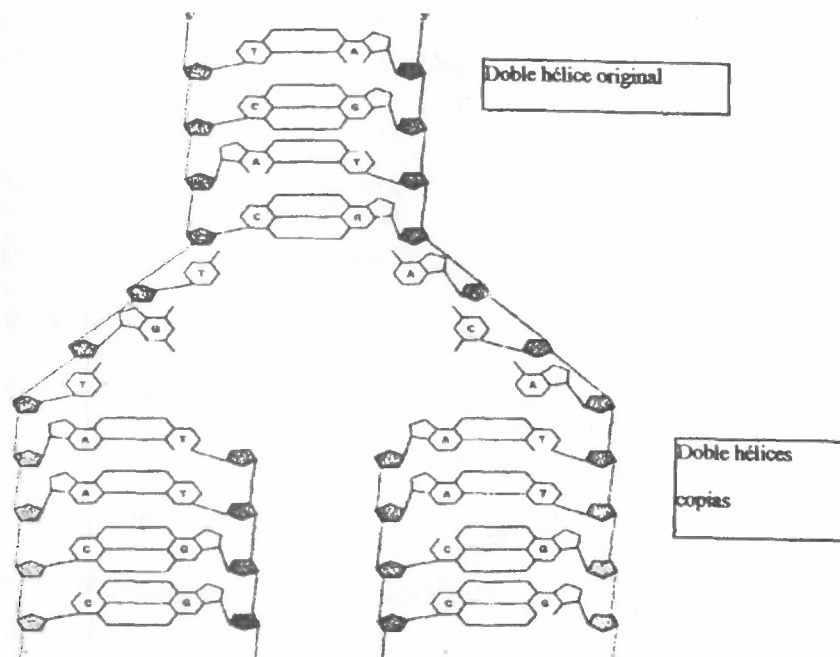


Figura 2. Ilustración del proceso de duplicación del ADN.

En el siguiente paso la ARN-polimerasa-ADN-dirigida permite la formación de hebras iniciadoras de ARN sobre las dos hebras de ADN patrón. Estas iniciadoras pueden tener una longitud que abarca de 50 a 100 residuos.

La acción del complejo polimerasa III y copolimerasa III, que opera en presencia de ATP permite la formación de la hebra guía o líder en dirección 5'→3' sobre la hebra patrón 3'→5' del ADN patrón. La síntesis comienza por la adición de residuos desoxiribonucleótidos al extremo 3' del tramo cebador de ARN. El ADN inicialmente se replica en segmentos cortos denominados *fragmentos de Okazaki* que pueden ser de 1,000 a 2,000 nucleótidos. Estos segmentos son unidos rápidamente por enlaces covalentes. Una vez se forman los fragmentos de Okazaki, la polimerasa I o la ribonucleasa H separa el ARN iniciador a partir de su extremo 5'.

4.1.3 BIOSISTEMÁTICA Y MARCADORES MOLECULARES

La biología sistemática analiza los patrones de variación entre los productos de la evolución y determina qué tan relacionados están estos. El análisis de la variabilidad de una población se realiza con la evaluación de la variación de marcadores genéticos. Los marcadores genéticos se pueden clasificar en tres categorías: los morfológicos, los bioquímicos y los moleculares.

Los marcadores morfológicos son aquellos que afectan caracteres observables en la apariencia macroscópica de la planta. Algunos ejemplos son el hábito de crecimiento, color de flor, número de cotiledones en las semillas. Desafortunadamente, este tipo de marcadores son afectados por condiciones ambientales, que pueden enmascarar el efecto del gen o los genes responsables de dichos rasgos heredables. Los marcadores morfológicos son y seguirán siendo esenciales para analizar la variabilidad de las poblaciones. Sin embargo su poder de discriminación es limitado sobre todo entre individuos cercanamente relacionados o bajo diferentes condiciones ambientales.

Los marcadores bioquímicos que han sido más ampliamente usados en la taxonomía y la genética aplicada son las isoenzimas. Sin embargo, estos marcadores presentan las desventajas de que requieren de un

proceso analítico especializado que incluye diferentes reactivos de tinción para cada sistema enzimático que se trabaje y el número de marcadores es insuficiente para muchas de las aplicaciones ya que presentan poco polimorfismo. Por otro lado, estos marcadores son susceptibles a efectos ambientales.

La detección y aprovechamiento del polimorfismo en la secuencia del ADN que ocurre en forma natural representa uno de los acontecimientos recientes más significativos en biología molecular. Este polimorfismo detectado entre diferentes individuos es lo que da origen a los marcadores genéticos moleculares. Los marcadores genéticos moleculares tales como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) están siendo rápidamente incorporados en el conjunto de técnicas utilizadas por taxónomos, genetistas y mejoradores.

Estas técnicas tienen diversas ventajas sobre los marcadores genéticos tradicionales entre las que se pueden citar: a) Son útiles en todos los organismos analizados a la fecha; b) Siguen el tipo de herencia mendeliano; c) Comúnmente es detectado alto nivel de polimorfismo; d) El poder de discriminación de los marcadores basados en ADN es alto; e) Son detectables en todos los tejidos y en todos los estados de desarrollo; f) Debido a la posibilidad de producir mapas de ligamiento, tienen el potencial de ser usados para estudiar caracteres poligénicos; g) En el caso de los RFLP, son codominantes.

4.1.3.1 Extracción de ADN genómico de plantas

Antes de aplicar cualquier técnica de marcadores moleculares el primer paso es obtener ADN del organismo de interés. Se han publicado muchas técnicas para la extracción de ADN de plantas, sin embargo todas se basan en el mismo principio: tomar una muestra de tejido, molerlo, extraer el ADN con un amortiguador específico, retirar el bagazo, precipitar el ADN, lavar y verificar la calidad y concentración de este.

4.1.3.2 Técnica de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica se basa en la digestión del ADN genómico utilizando enzimas de restricción que cortan en regiones específicas originando así fragmentos de ADN de distintos tamaños. Estos fragmentos se separan por electroforesis en agarosa para luego transferirlos a una membrana de nitrocelulosa. Luego se aplica una sonda radioactiva con una secuencia de bases conocida la cual se hibridiza con las secuencias complementarias que pueda encontrar en los fragmentos(41). De esta manera puede detectar los polimorfismos que un alelo puede mostrar. Además de ser útil para detectar polimorfismos esta técnica se utiliza ampliamente para ubicar la localización de una determinada secuencia o genes dentro de los cromosomas.

4.1.3.3 Técnica de polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Al igual que los RFLP en los AFLP el fundamento es la digestión del ADN en fragmentos utilizando restrictasas para sitios específicos. Luego de realizar el corte, se ligan adaptadores en los sitios de restricción. Estos tienen una secuencia de bases que les permite ligarse a los sitios de restricción y otra también predeterminada la cual servirá de molde en las reacciones de PCR donde se utilizan primers complementarios a dichos adaptadores. Luego los productos de PCR son visualizados en geles de poliacrilamida (22).

4.1.3.4 Técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs)

Dos herramientas ahora universales en la biología molecular son el uso de enzimas de restricción y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (29), conocida por sus siglas en inglés como PCR (polymerase chain reaction). La reacción de polimerización en cadena permite la amplificación específica de secuencias de ADN. La técnica de marcadores RAPDs descrita inicialmente en 1,990 por Williams *et al.*, se basa en el uso de iniciadores únicos de la reacción de polimerización. La reacción se realiza como se describe a continuación (ver figuras 3 y 4):

i. Desnaturalización térmica de las moléculas de ADN de doble cadena. Las dos cadenas de la doble hélice se separan completamente cuando todos los enlaces de hidrogeno entre ellas son rotos. El proceso de separación de cadenas es llamado desnaturalización y puede ser llevado a cabo a temperaturas entre 85 y 95°C. Esta temperatura dependerá de la proporción de pares de bases G-C (guanina-citocina) en la doble hélice.

Debido a que cada par de bases tiene tres enlaces de hidrogeno, es más estable que un par de bases ATA (adenina-timina), que tiene solamente dos enlaces. Cuanto más pares de bases G-C estén contenidos en un segmento de ADN, mayor energía es necesaria para separar las dos cadenas.

ii. Alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores con las secuencias homólogas del ADN genómico. Enseguida se baja la temperatura de la reacción (entre 50 y 55°C durante 2 minutos) para permitir el apareamiento de los iniciadores de la reacción con secuencias homólogas del ADN genómico. Una vez apareado el iniciador se inicia la síntesis a partir de éste. Para muchas plantas los iniciadores de 9-10 nucleótidos de longitud generan de 2 a 10 fragmentos RAPD en promedio.

iii. **Separación de los fragmentos copiados.** Para poder separar los fragmentos copiados se aplica una temperatura de 72°C durante 2 minutos. Estos segmentos amplificados son utilizados como moldes en el siguiente ciclo, aumentando exponencialmente las secuencias blanco en cada ciclo, de tal manera que la concentración de segmentos amplificados es tan alta que puede detectarse con procedimientos electroforéticos.

iv. **Detección de diferencias entre individuos en un gel de agarosa.** Los cambios en o alrededor de las regiones de homología con el ADN de la planta provocan cambios en la capacidad de un fragmento a ser amplificado y causa el polimorfismo. Esas diferencias pueden ser detectadas por técnicas electroforéticas convencionales y visualizados por iluminación ultravioleta (UV) de geles de agarosa impregnados con bromuro de etidio, con el que los fragmentos forman complejos fluorescentes.

4.1.3.5 Ventajas de la técnica RAPD para el análisis de variabilidad genética

El análisis de la variabilidad entre cultivares para los procesos de fitomejoramiento se hace generalmente con marcadores morfológicos, que como vimos, no pueden presentar un cuadro preciso debido a influencias ambientales. El análisis RAPD es una herramienta sencilla, rápida y relativamente precisa para caracterizar colecciones de germoplasma.

La técnica de los RAPDs tiene diversas ventajas sobre la técnica de los RFLP. Los RAPDs utilizan bajas cantidades de ADN, 10~50 ng, mientras que los RFLP utilizan mayores cantidades, 2-10 µg, por mezcla de reacción. Por otra parte para la reacción de amplificación, los RAPDs requieren ADN de calidad cruda, mientras que los RFLP requieren de ADN relativamente puro. Por otro lado, los RAPDs, evalúan el genoma completo, mientras que los RFLP inspeccionan regiones de bajas repeticiones o regiones codificantes. De ahí que a diferencia de la técnica de los RFLP, los RAPDs requieren de secuencias cortas de

DOBLE CADENA DE ADN



Separación de las hebras
94°C 1 min.



síntesis 35°C 1 min.



Unión del iniciador al molde y síntesis del
fragmento

35°C 1 min.



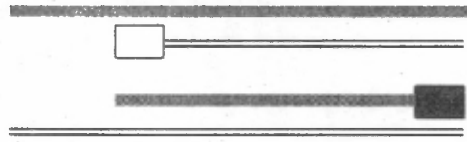
Separación de los fragmentos copiados

72°C 2 min.

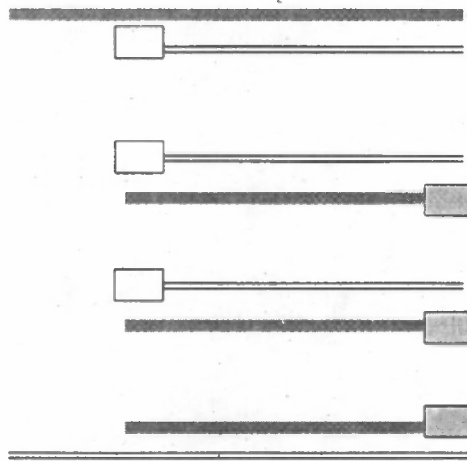


Figura 3. Ilustración del proceso de PCR

Ciclo 1



Ciclo 2



40 ciclos

1,099,511,627,776

Numero de copias = $2^C - 2$

C: No. de ciclos

Figura 4. Ilustración del proceso de los RAPDs

9 ó 10 bases al azar, mientras que los RFLP utilizan sondas específicas de ADN de repeticiones bajas o clonas de ADNc. En este caso, la principal dificultad en los RFLP es obtener sondas específicas o universales las cuales no siempre están disponibles libremente.

En términos de costos y sencillez, la técnica de RAPD es la más apropiada para realizar estudios de variabilidad. Al comparar los RAPDs con los AFLP, éstos tienen alto potencial discriminatorio, sin embargo son muy costosos, necesitan equipo sofisticado.

Finalmente, una de las principales ventajas de los RAPDs sobre los AFLP y RFLP juntos, es que los RAPDs no usan radioactividad. Este aspecto es especialmente relevante en países en vías de desarrollo, donde los suministros y el permiso para el uso y destrucción de residuos radioactivos son a menudo problemáticos. Recientemente, los métodos no radioactivos eficientes han sido desarrollados y esto ha empezado a aliviar estos problemas.

Por otro lado, es de notar que la crítica más fuerte de la técnica RAPD es la pobre consistencia de los resultados dentro de un mismo laboratorio y entre diferentes laboratorios. Sin embargo, si se toma el cuidado esencial mínimo para todas las reacciones PCR (limpieza y ninguna contaminación de reactivos), entonces las reacciones serán siempre consistentes, como mínimo dentro de un mismo laboratorio.

En el caso del análisis RAPD, la metodología es mucho más simple, sin embargo es costoso debido a la necesidad de un termociclador y los gastos para comprar o sintetizar los oligonucleótidos y los componentes de la reacción. Estos inconvenientes son balanceados por el uso de juegos estándar de oligonucleótidos sin la necesidad de construir primero y tamizar bibliotecas genómicas o de ADNc, permitiendo el fácil acceso a la tecnología para grupos de investigación no esencialmente orientados hacia biología molecular.

La técnica RAPD suministra un conjunto ilimitado de descriptores con qué comparar plantas individuales. El grado de similitud puede ser cuantificado determinando la fracción de marcadores compartidos y el número total de marcadores que han sido comparados.

Cuadro 1. Comparación entre algunos marcadores genéticos.

CARACTERÍSTICA	RAPD	AFLP	RFLP	ISOENZIMAS	MORFOLOGÍA
Técnica sencilla	Sí	Si	Si	Si	No
Equipo sofisticado	Medianamente	Si	No	No	No
Efectos ambientales	No	No	Posible	Posible	Si
Uso de radioactividad	No	Si	No	No	No
Iteración génica	No	No	Posible	Posible	Si
Dependencia del estado de desarrollo	No	No	Posible	Posible	Si
Co.dominancia	No	No	Si	Si	Algunas veces
Costo	Moderado	Alto	Bajo	Bajo	Bajo

Tomado de Amador (1)

4.2 MARCO REFERENCIAL

4.2.1 UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN CAÑA DE AZÚCAR

Las isoenzimas fueron los primeros marcadores bioquímicos que se utilizaron en la identificación varietal de la caña de azúcar. Los trabajos realizados con esta técnica durante los años de 1969 a 1983 (21) (35), aportaron nuevos conocimientos para el estudio de la genética de la caña de azúcar. Eksomtramage *et al.* (15) en 1992 pudieron diferenciar las variaciones que presentan *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi* y *S. sinense*, así como la contribución de estas especies en el genoma de 63 variedades comerciales. Sin embargo, Debido a la reducida diversidad que existe en *S. officinarum* y a la escasa contribución de las otras especies en la formación de las variedades comerciales, los 21 marcadores polimórficos que obtuvo no fueron suficientes para detectar diferencias significativas en las 63 variedades cuyo genoma hubiese tenido una contribución alta de *S. officinarum*, recomendando él mismo el uso de marcadores de ADN (RFLP) para realizar análisis más detallados y diferenciar individuos entre grupos de polimorfismo reducido.

En 1993 D'Hont *et al.* (16) realizan el primer análisis de la diversidad genética en caña de azúcar utilizando RFLP. La metodología de los RFLP hasta el momento es la que proporciona una mejor resolución en el análisis del genoma, pudiendo diferenciar aún entre grupos de organismos muy similares, además permiten detectar heterocigotos pues expresan codominancia. A partir de 1993 hasta ahora se han publicado muchos trabajos en los cuales se emplea esta técnica. En 1994 Lu *et al.* (26) hacen un análisis de la diversidad genética y la estructura del genoma en 40 variedades de caña de azúcar logrando detectar 411 fragmentos polimórficos. Los trabajos posteriores se orientaron significativamente a descifrar la organización del genoma (19), a detectar marcadores asociados a características de interés (9) (13) y a la construcción de mapas genómicos (14). No obstante la gran utilidad en el análisis del genoma poliploide, los

RFLP presentan grandes dificultades metodológicas, pues se necesitan grandes cantidades de ADN con un alto grado de pureza así como sondas radioactivas con una secuencia de ADN que debe ser previamente conocida.

A partir de 1990 cuando Williams *et al.* (42) establecen la técnica de los RAPDs, la necesidad de una sonda específica de secuencia conocida y el uso de radioactividad eran superados por la utilización de oligonucleótidos con una secuencia al azar y la reacción en cadena de la polimerasa que permite la amplificación de los segmentos detectados por los oligonucleótidos iniciadores. Es así como surge una nueva técnica que permite el análisis genómico de una manera más sencilla aunque un poco menos precisa. Los primeros trabajos en caña de azúcar utilizando RAPDs se refieren principalmente a la estandarización y validación de las metodologías. En 1994 Harvey *et al.* (19) con la técnica de los RAPDs logra hacer una diferenciación entre 21 variedades de caña de azúcar generando 101 marcadores polimórficos, usando 41 oligonucleótidos iniciadores. Ese mismo año Almeida (2) genera marcadores RAPDs para dos variedades comerciales utilizando 20 iniciadores. En 1999 Nair *et al.* (30) demuestran convincentemente la eficacia de los RAPDs para identificar relaciones filogenéticas en el denominado complejo *Saccharum* el cual incluye a *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. robustum*, *S. spontaneum* y a los géneros *Narenga* y *Sclerostachya*.

4.2.2 DETECCIÓN DE VARIBILIDAD EN CAÑA DE AZÚCAR Y OTRAS ESPECIES UTILIZANDO MARCADORES RAPDs

Rodríguez *et al.* (33) al comparar 134 accesiones de *Capsicum* en las cuales se incluye a 6 especies diferentes y utilizando 110 marcadores polimórficos, reportan un promedio de similitud de 53 % (tabla 1). Santos *et al.* (36) en 1994 analiza la variabilidad que existe en *Brassica oleracea* utilizando variedades de

polinización libre, híbridos comerciales y progenitores de los híbridos. Obtuvo 181 marcadores polimórficos los cuales revelaron un índice promedio de similitud de 74.5%. La similitud promedio reportada para 96 accesiones de *Lycopersicon esculentum* procedentes del viejo y del nuevo mundo fue de 83.6% (39). Con estos ejemplos puede verse como los cultivos en los cuales se ha realizado mayor selección y mejoramiento

Tabla 1. Comparación de la variabilidad que puede detectarse con RAPDs en distintas especies

CULTIVO	INDICE DE SIMILITUD (%)	No. DE MARCADORES RAPDs	No. DE BANDAS POR PRIMER
<i>Capsicum ssp.</i>	53	110	4.4
<i>Phaseolus vulgaris</i>	62.6	106	4.24
<i>Glycine ssp.</i>	66.4	80	1.56
<i>Brassica oleracea</i>	74.5	181	12.06
<i>Lycopersicon esculentum</i>	83.6	98	2.27
<i>Saccharum ssp.</i>	65	135	2.4
<i>S. officinarum</i>	79.28	195	16.25
<i>S. robustum</i>	71.8		
<i>S. barberi</i>	66.32		
<i>S. sinense</i>	65		
<i>Saccharum ssp.</i>	75.6	54	4

la variabilidad disminuye, no así en las especies que permanecen más intactas. La caña de azúcar es un cultivo que se inició con *Saccharum officinarum*. Tiempo después se realizaron cruza interespecíficas e incluso intergénero. Sin embargo el mejoramiento en la caña se ha caracterizado por una fuerte endogamia que tiende a disminuir su variabilidad. Según el reporte de Nair *et al.* (30), en el cual compara clones que pertenecen a 4 especies dentro del género *Saccharum*, se tiene una similitud de 79.28% para *S. officinarum*, 71.8% para *S. robustum*, 66.32% para *S. barberi* y 65% para *S. sinense*. Sánchez *et al.* (35) obtuvo 135 marcadores polimórficos en 21 variedades que revelan un promedio de similitud de 65%.

4.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL VEGETAL

El material utilizado procede de la colección nacional de caña de azúcar a cargo de CENGICAÑA. En el cuadro 2 se muestran los 6 grupos formados según un análisis de componentes principales con base a características fenotípicas (altura, grados brix, porcentaje de fibra, diámetro medio del tallo, largo medio de la hoja, ancho medio de la hoja, porcentaje de sacarosa, de glucosa y fuctosa). Según el análisis de conglomerados para el cual se utilizó el método de ligamiento promedio (average linked), las 114 variedades conforman 14 grupos descritos en el anexo 1. En el anexo 3 se muestra el listado de características fenotípicas para cada una de las variedades.

Cuadro 2. Descripción de los grupos formados según análisis de componentes principales

GRUPO	CARACTERÍSTICAS	VARIEDAD
I	Diámetro medio del tallo y ancho medio de la hoja de <u>regular</u> tamaño y con valores grandes para pol, grados brix, sacarosa. Con bajas concentraciones de glucosa y fructosa.	CP 881540 CP 811384 CP 63588 CL 61620 L 7921 CP 57603 CP 731547 PR 61632 PR 783005 MEX 73523 CB 4013 EROS
Ia	Es grupo reúne materiales con <u>regular</u> desarrollo del diámetro y ancho medio de hoja, <u>regular</u> presencia de pol, grados brix, sacarosa, glucosa y fructosa.	NA 5642 CO 270
Iib	En este grupo se encuentran materiales de caña de azúcar con <u>regular</u> desarrollo de diámetro del tallo y ancho medio de la hoja. <u>Menor</u> presencia de pol, grados brix y sacarosa. Además son de los materiales que tiene <u>mayor</u> concentración de glucosa y fructosa.	B 76385 GLORIA 57 EPC 48863
III	Los materiales de este grupo tienen <u>poco</u> desarrollo en el diámetro medio del tallo, y ancho medio de la hoja. <u>Poco</u> contenido de pol, grados brix, y sacarosa. <u>Buena</u> concentración de glucosa y fructosa.	CP 27130 B 4363 B 49119 MEX 72458 MEX 742400 MEX 59430
IVa	Este grupo de materiales presenta <u>muy poco</u> desarrollo de diámetro medio de tallo, pol, grados brix, y concentración de sacarosa. Es uno de los grupos con <u>regular</u> concentración de glucosa y sacarosa.	PR 872080 TUC 6819 PINDAR
IVb	Este grupo de materiales de caña de azúcar presenta <u>poco desarrollo</u> del diámetro medio del tallo y ancho medio de la hoja. Y <u>regular</u> contenido de glucosa y fructosa y son los que tienden a presentar el <u>mayor</u> contenido de pol, grados brix y sacarosa	L 7812 CP 65357 CP 5659 CP 63588 CP 881066 CP 721312

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL:

Determinar la similitud genética existente en 39 genotipos de caña de azúcar (*Saccharum ssp.*).

5.2 ESPECÍFICOS:

- Identificar los oligonucleótidos iniciadores con los cuales se detecten regiones de alto polimorfismo entre las variedades en estudio.
- Obtener patrones de fragmentos de ADN para establecer el grado de similitud genética entre los 39 genotipos.
- Establecer la relación entre la similitud genética y la genealogía de los genotipos más cercanos y los más lejanos.

6. HIPÓTESIS

Existen diferencias genéticas entre los 39 genotipos de caña de azúcar.

7. METODOLOGÍA

7.1 FUENTE DEL MATERIAL VEGETAL.

CENGICAÑA realizó una caracterización fenotípica con las 144 variedades que son utilizados como progenitores en el programa de mejoramiento. Luego de esta caracterización se clasificó a las variedades según un análisis de componentes principales y de conglomerados en 6 grupos y 14 grupos respectivamente. Para conocer la relación genética a nivel molecular entre los distintos cultivares, se utilizaron 39 individuos de *Saccharum* spp (ver anexo 2) escogidos de entre los grupos fenotípicos, de manera que todos los grupos estuviesen representados. Todo el material provenía de una plantación de 3 años. Se utilizaron brotes vegetativos (hijuelos) que median entre 20 y 45 cm de longitud, libres de patógenos y con una buena condición general de los cuales se utilizó el meristemo y las hojas más jóvenes.

7.2 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE LOS CULTIVARES DE CAÑA EN ESTUDIO

El ADN se extrajo de yemas vegetativas de *Saccharum* según la siguiente metodología (10): El tejido se pulverizó utilizando nitrógeno líquido en un mortero, de 0.5 a 1.0 g de muestras. Seguidamente las muestras se vaciaron en tubos de plástico de 1.50 ml conteniendo 0.6 ml de un amortiguador de reacción. Dicho amortiguador se conforma de Tris-HCl 100mM pH 8.0 (Trishidroximetilaminometano -HCl), EDTA 50 mM (ácido etilendiaminetetraacético), NaCl 500 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y dodesilsulfado de sodio (SDS) 1.33%. Posteriormente se agitó e incubó a 65°C durante 10 minutos en un baño con temperatura controlada. A continuación a las muestras se les añadió 0.3 ml de acetato de potasio 5 M, se agitó e incubó en hielo por 60 minutos con el objeto de precipitar el ADN. Luego se centrifugó a 18,000 r.p.m. durante 20

minutos. El sobrenadante se vació en otros tubos conteniendo 0.60 ml de isopropanol frío y las muestras pasan a incubación a 4⁰C por 2 horas con la finalidad de condensar las hebras del ADN.

Utilizando ganchos de vidrio estériles se colectó el ADN en madejas condensadas y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml conteniendo 0.2ml de un amortiguador TE de dilución, conformado por Tris-HCl 50 mM y EDTA 10 mM.

7.3 PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR EL ADN DE CONTAMINANTES, VERIFICACIÓN DE PUREZA Y VERIFICACIÓN DE INTEGRIDAD

Con el objeto de limpiar el ARN contaminante se agrega 1 µl de ARNasa. Los carbohidratos, proteínas y ARN digerido, fueron eliminados agregando en proporción de 1:1 (v/v) una mezcla de fenol-cloroformo-alcoholisoamilico (50%, 48% y 2% respectivamente), se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 10 minutos. Luego se colectó el sobrenadante y se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol al 70% frío (4⁰C) y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 4.8-5.2. Luego se deja reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Las muestras se someten a centrifugación y el sobrenadante es desechado. Se procedió a lavar dos veces la pastilla con etanol al 70% y a continuación se secaron las muestras a 37⁰C. Finalmente la pastilla se resuspende en el amortiguador TE y las muestras se almacenan a -20⁰C.

La concentración y pureza del ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Para verificar la integridad las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% luego esta se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µgr/ml.

7.4 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Para la amplificación se utilizó de 15-24 ng de ADN de *Saccharum* en volumen de 15-24 μ l de mezcla de reacción (10 mM Tris-HCl pH8.3, 10mM KCl, 4mM MgCl₂, 0.1mM de cada dNTP, 0.2 μ M de primer y 1 U de *Taq*-polimerasa). Se utilizaron 48 oligonucleotidos de secuencia conocida. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 3 minutos a 94⁰C, 1 minuto a 4⁰C y 2 minutos a 72⁰C con un cambio térmico de 2.4⁰C/segundo; seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94⁰C, 1 min a 4⁰C y 2 minutos a 72⁰C con un cambio térmico de 2.4⁰C/segundo; y un ciclo final de 72⁰C por 7 minutos.

7.5 DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FRAGMENTOS RAPDS

El proceso de electroforesis consiste en someter al ADN, sostenido por un sustrato (agarosa) a un campo eléctrico en el cual éste se desplaza hacia el polo positivo. Los distintos fragmentos de ADN se desplazan según sea su peso molecular, siendo esta una relación inversamente proporcional (los más pesados se desplazan menos y los livianos más). Para este caso particular se utilizó la agarosa a una concentración de 1.5% diluida en TBE (Tris-base, ácido bórico y EDTA). Luego se transfiere el gel a un recipiente que contiene bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ gr/ml, aquí se deja sumergida durante 30 minutos, luego se coloca en agua durante 20 minutos para eliminar el exceso de colorante. Para visualizar los fragmentos de ADN se utiliza un transiluminador ultra violeta (320 nm). Posteriormente se obtienen fotografías instantáneas del gel para almacenar la información. Las bandas que se toman en consideración son las más visibles (de mayor intensidad) que sean mayores de 300 y menores de 1800 pares de bases (pb), esto con el objeto de evitar la ambigüedad de los datos.

7.5.1 VARIABLES EN ESTUDIO

a) **Distancia de migración de los fragmentos RAPDs.** Mediante las fotografías se determina la distancia de migración de los fragmentos midiendo con una regla milimétrica su desplazamiento.

b) **Calibración de la longitud de los fragmentos.** Con los datos de tamaño y distancia recorrida por los fragmentos del estándar de peso molecular utilizado y con los datos de distancia de los marcadores RAPDs generados, se procede a calcular el tamaño de dichos RAPDs por extrapolación logarítmica.

c) **Número de fragmentos producidos.** Las impresiones de los fragmentos considerando el grado de intensidad de fluorescencia así como el número de fragmentos generados por cada uno de los oligos en cada uno de los individuos son registrados en hojas de cálculo. En dichas hojas los fragmentos son ubicados conforme a la distancia recorrida en el gel y a su tamaño.

e) **Presencia o ausencia de fragmentos.** También se construyen tablas de valores de presencia/ausencia de marcadores RAPDs para todos los patrones de fragmentos obtenidos, según sea la presencia o ausencia de un determinado fragmento. Se asigna el valor de 1 para la condición de "presencia de fragmento" y 0 para la condición de "ausencia de fragmento".

7.6 EVALUACIÓN DEL GRADO DE SIMILITUD ENTRE INDIVIDUOS DE UNA MISMA POBLACIÓN

Con la metodología RAPDs es posible hacer comparaciones de similitud sólo cuando existe la presencia de las bandas, es decir si un individuo presenta una banda y otro no, pueden compararse; si entre dos individuos no existe banda alguna es imposible compararlos los fragmentos compartidos. No se puede tener certeza de la proporción del genoma compartido cuando hay ausencia de bandas en ambos individuos. Por lo tanto, se utilizará para hacer el análisis el índice de Dice (37), el cual toma en cuenta sólo las

coincidencias positivas (presencia de bandas) y les asigna doble peso. El índice de Dice se calcula de la siguiente manera:

$$S_{A,B} = 2N_{A,B}/(N_A + N_B) \times 100$$

en donde $N_{A,B}$ es el número de bandas compartidas por los individuos A y B, y N_A y N_B es el número de bandas en los individuos A y B, respectivamente. La medida de similitud puede también ser llamada proporción de fragmentos compartidos.

La proporción de fragmentos compartidos, $S_{A,B}$ nos da un estimado de la similitud genética. Esto es porque si dos individuos tienen exactamente la misma secuencia de bases en todo su genoma, presentarán un patrón de fragmentos idéntico. Por tanto $S_{A,B} = 100$, excepto cuando se tienen errores experimentales. Sin embargo, aun cuando dos secuencias de ADN sean totalmente diferentes, podrán presentar algunas bandas comunes por azar, pero el valor de $S_{A,B}$ tenderá a ser pequeño.

7.7 OBTENCIÓN DE LA DISTANCIA GENÉTICA ENTRE INDIVIDUOS DE UNA MISMA POBLACIÓN

La distancia genética entre dos individuos es una función decreciente de la similitud y se expresa como :

$$\text{Distancia entre A y B } (D_{A,B}) = 100 - S_{A,B}$$

Los valores de similitud y distancia sirvieron para construir las matrices correspondientes. Con la información que proporcionan las matrices y mediante el sistema SSPS (versión 9.0 para windows) se realizó un análisis de conglomerados utilizando el método de ligamiento promedio (38), luego se procedió a graficar un fenograma.

7.8 COMPARACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DETECTADA CON RAPDS Y LA GENEALOGÍA

Luego de tener los datos de similitud y distancia, se procedió a describir el pedigrí de las variedades más alejadas y las más cercanas.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. SELECCIÓN DE INICIADORES

Para este estudio se utilizaron 48 iniciadores, de 10 pares de bases escogidos de entre las series A,AA,AB,AC,B,C y D de Operon Technologies, Inc. Los códigos de los iniciadores se derivan de la compañía fabricante (OP), la serie alfabética y la serie numérica.

Utilizando 3 de los mejores¹ iniciadores por la literatura (19)(2)(32) los cuales detectaron mayor polimorfismo, se hizo una selección de las variedades más alejadas genéticamente. Los iniciadores fueron el OPA-4,OPB-11 y OPB-7². Luego de analizar la información obtenida con estos 3 iniciadores, el valor promedio de similitud entre las 39 variedades fue de 75% (25% de disimilitud). Se eligió un valor de

¹ En el estudio realizado por Harvey en 1994, los iniciadores OPA-4, OPB-11 y OPB-19 detectaron 12, 11 y 9 loci polimórficos respectivamente. Cabe señalar que no son los mismos valores que se obtuvieron para las variedades incluidas en el presente trabajo

² En este procedimiento preliminar se tomó en cuenta a bandas menores de 300 y algunas veces bandas tenues

disimilitud de 20% con el cual se pudo diferenciar tres grupos distintos entre los clones (figura 5). De cada uno de los grupos se seleccionó una variedad. Siendo estas CP 65357, PGM 89968 y MEX 69242. Luego con estas tres variedades, se probaron los 48 iniciadores antes mencionados. Se registró el número de fragmentos y el número de fragmentos polimórficos. Se ordenó de manera descendente en función del número de fragmentos polimórficos. Finalmente fueron utilizados 14 iniciadores (cuadro 3), los mejores 12 según el ordenamiento anterior³ y 2 de los recomendados por Harvey *et al* (19).

8.2. DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS FRAGMENTOS RAPDs

Para detectar los fragmentos amplificados se sometieron los productos de PCR a un proceso electroforético, como se describe en la metodología. La información se registró en fotografías (figuras 6 a 11). Los fragmentos tomados en cuenta son los que detectan polimorfismos (que estén ausentes en al menos un clon y presentes en el resto) los más claros y que son mayores de 300 bp y menores de 1,800 bp.

En las figuras 6 a la 11 puede apreciarse las fotografías de los patrones de bandas generados por los iniciadores OPAC-5, OPA-1, OPAC-1, OPB-1, OPB-5, OPB-7 respectivamente. Puede apreciarse que de estos iniciadores, el OPAC-1 y el OPB-7, son los que muestran más bandas polimórficas. Los otros aunque muestran poca diferencia entre la mayoría de los clones, resaltan las diferencias de algunos, como lo muestra la fotografía del OPB-1 en el cual el clon cp65357 se diferencia del resto de clones.

Para evaluar la información contenida en las fotografías se midió la distancia de migración de los fragmentos y se estimó su longitud. La presencia de un fragmento se codificó como 1 y la ausencia como 0. Luego se construyó una matriz con esta información (ver anexo 4).

El número total de marcadores polimórficos fue de 57 y el promedio por iniciador fue de 4 fragmentos polimórficos (tabla 2).

³ Los criterios para analizar las bandas fueron más rigurosos, según se describe en la metodología previamente

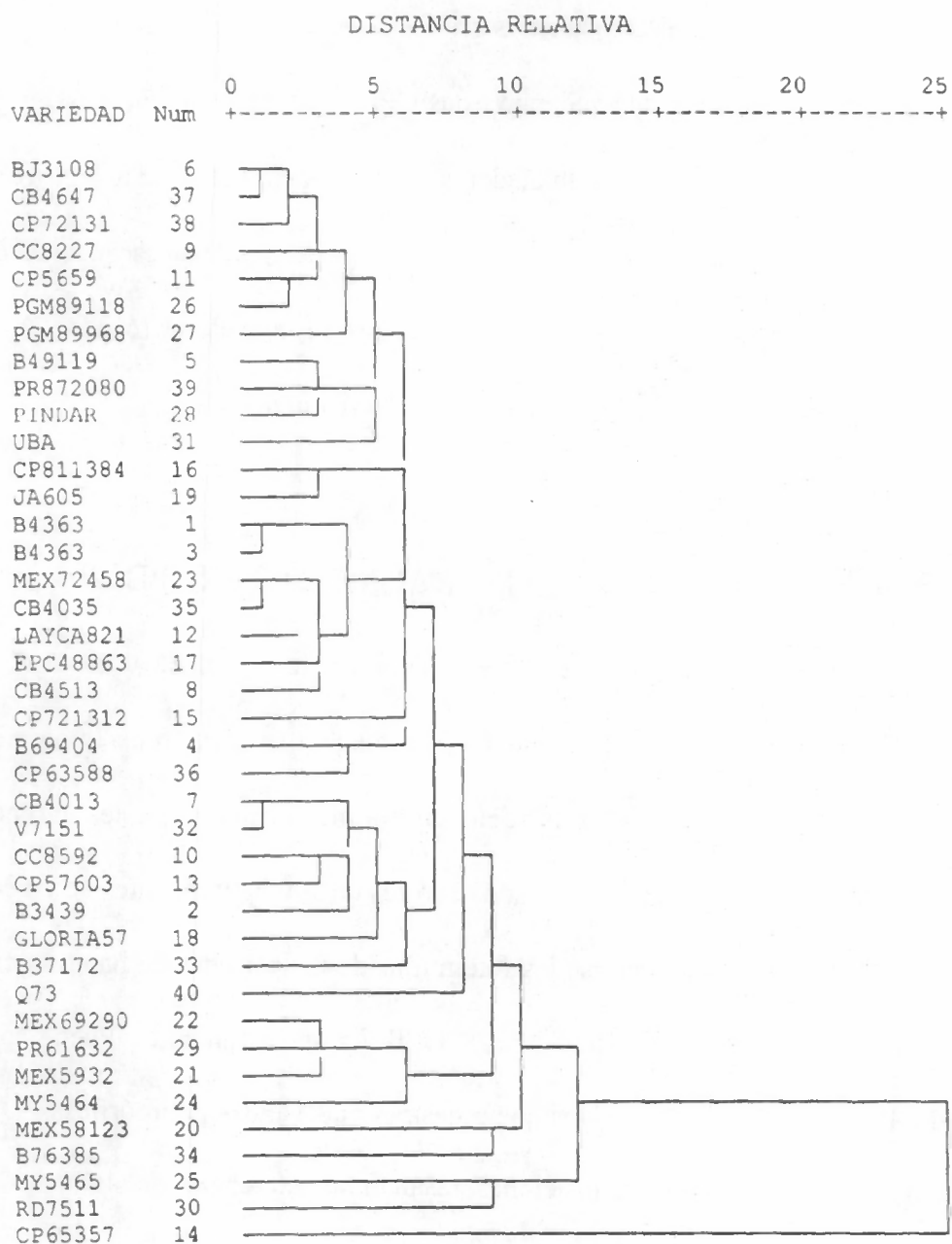


Figura 5. Fenograma utilizando el método de ligamiento promedio con la información obtenida con los iniciadores OPA-4, OPB-11 y OPB-7, en donde se describe la variabilidad de una población de 39 materiales de caña de azúcar.

Cuadro 3. Secuencia de bases nitrogenadas de los oligonucleotidos iniciadores de Operon Technologies utilizados para rastrear el polimorfismo en una población de 39 clones de caña de azúcar.

Código de Iniciador OP-	Secuencia de bases nitrogenadas
AC-5	GTTAGTTGCGG
AC-1	TCCCAGCAGA
B-7	GGTGACGCAG
AB-11	GTGCGCAATG
C-19	GTTGCCAGCC
AB5	CCCGAAGCGA
B-1	GTTTCGCTCC
C5	GATGACCGCC
B-5	TGCGCCCTTC
A1	AACGTTCCGC
D-3	GTCGCCGTCA
C13	AAGCCTCGTC
B19	ACCCCGAAG
B11	GTAGACCCGT

El grado de confiabilidad en la detección de la variabilidad depende del número de marcadores que se utilice. Al comparar el número de marcadores obtenidos en este estudio y los obtenidos en otras especies, este número es bajo pero muy útil para detectar variabilidad, si se toma en cuenta que anteriormente se han realizado estudios de variabilidad utilizando marcadores fenotípicos e isoenzimas que aportan menos marcadores. El estudio fenotípico llevado a cabo por CENGICANA tomó en cuenta únicamente 6 variables (marcadores). Ruiz (34) utilizando isoenzimas obtuvo 19 marcadores polimórficos.

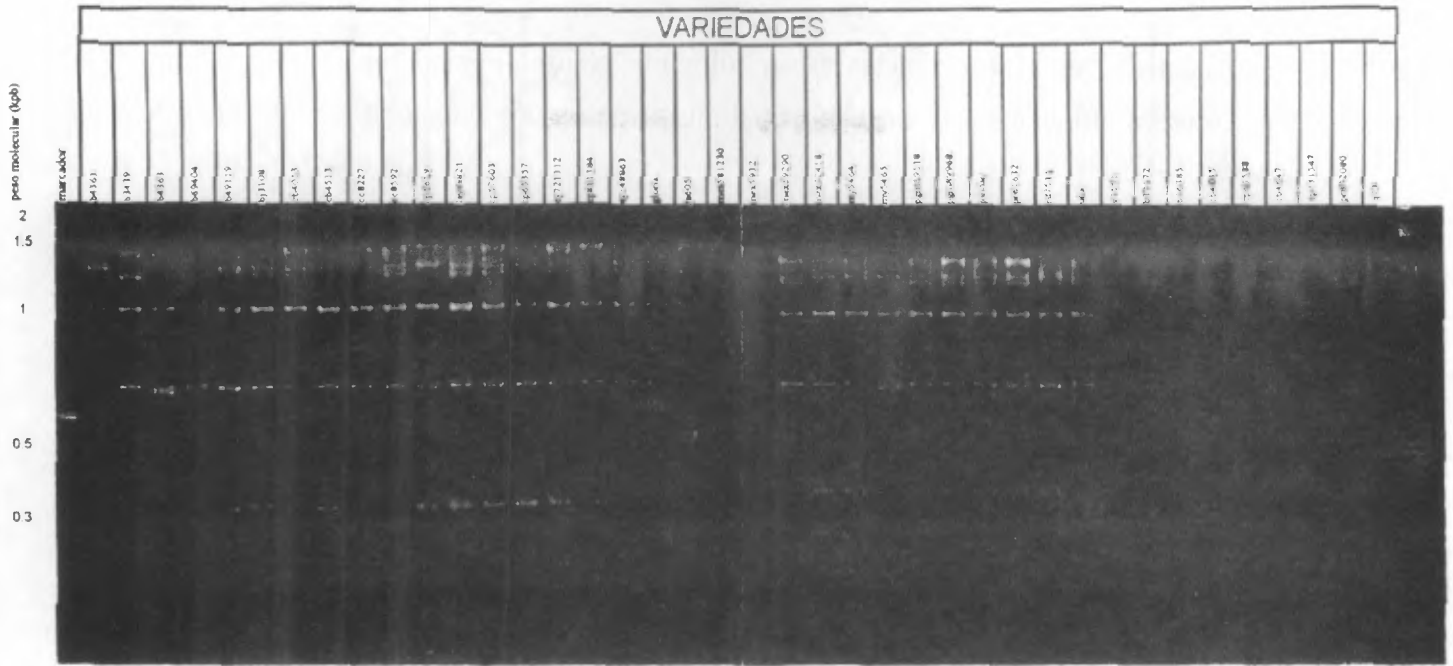


Figura 6. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPAC-5 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar .

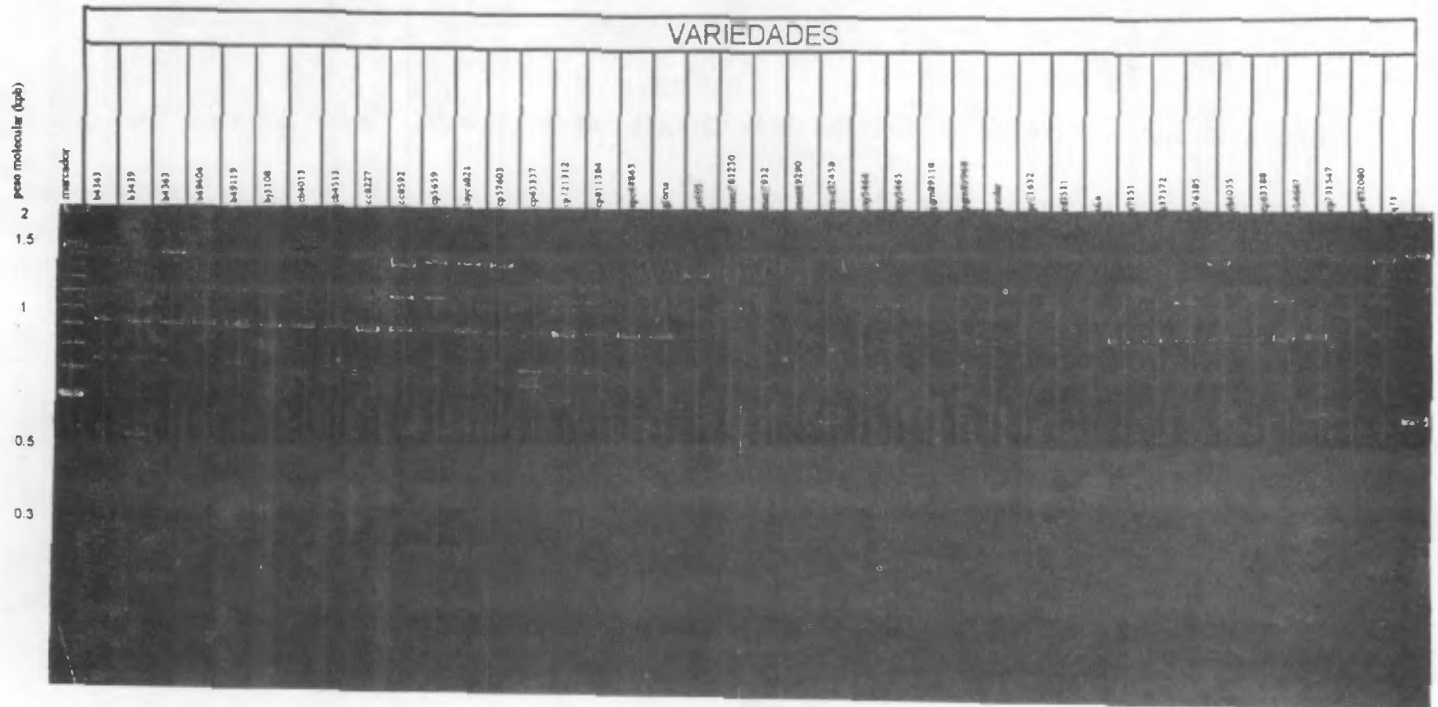


Figura 7. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPA-1 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar.

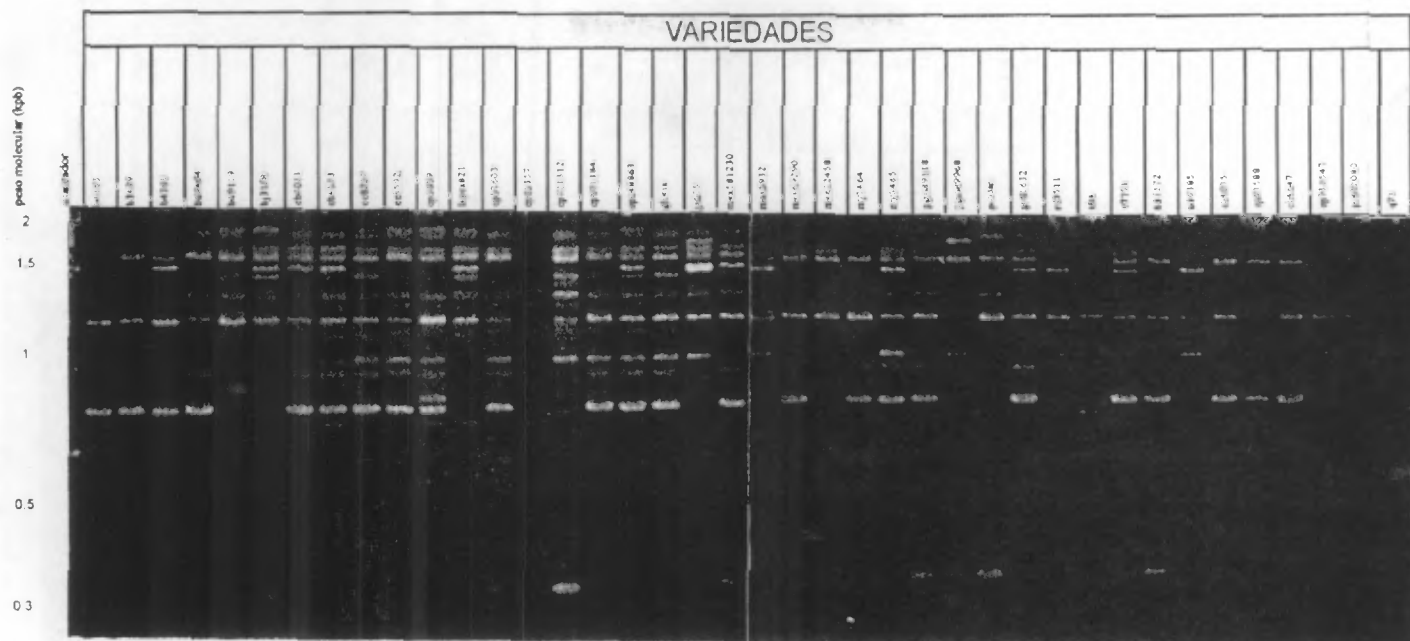


Figura 8. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPAC-1 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar.

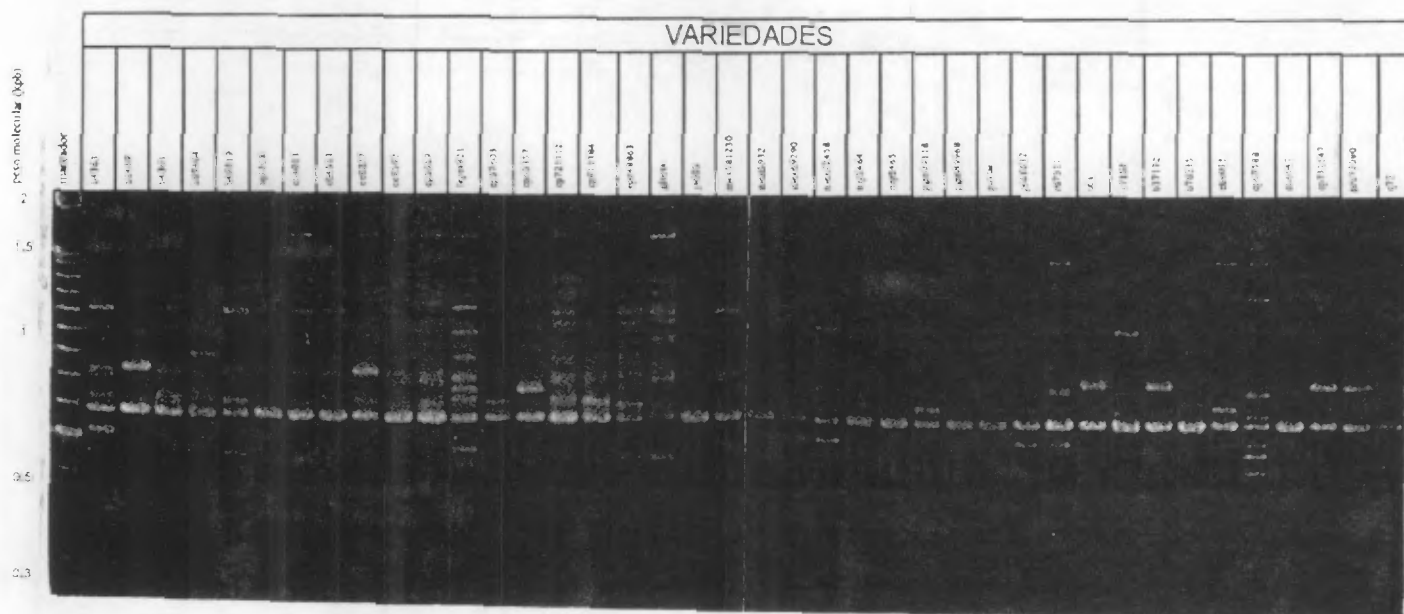


Figura 9. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPB-1 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar.

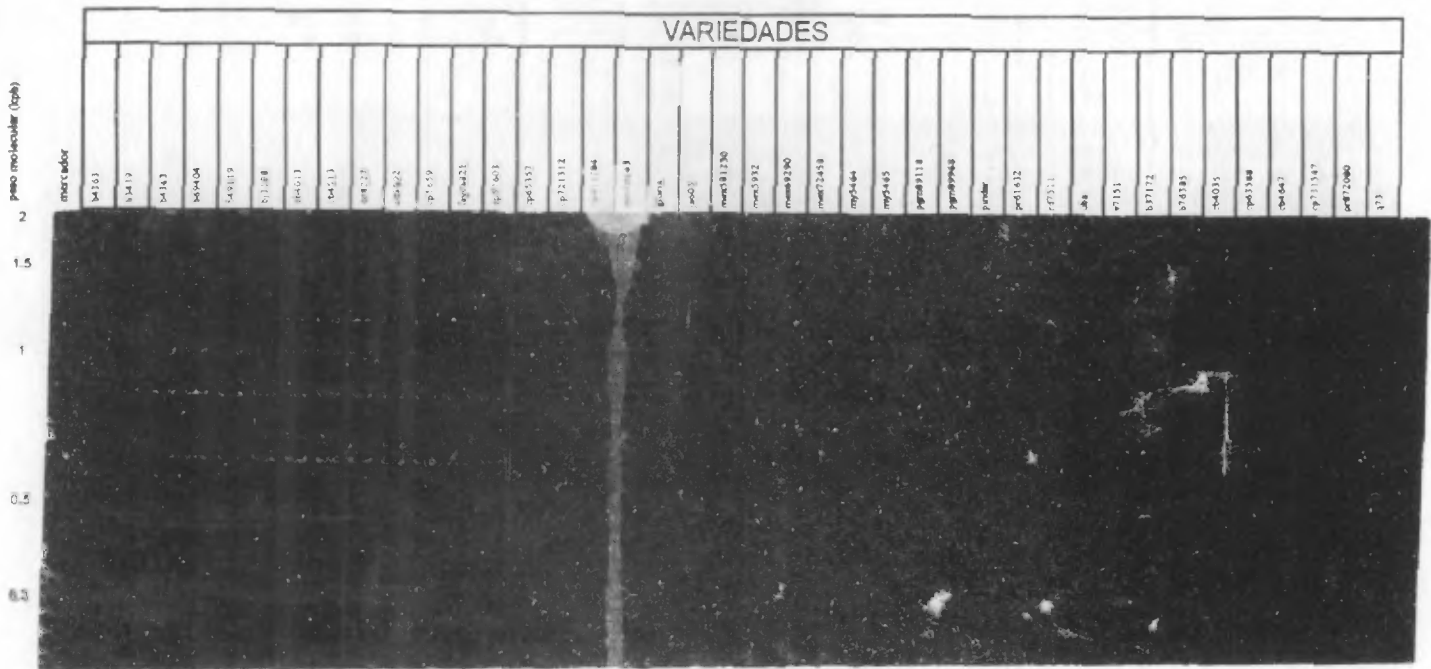


Figura 10. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPB-5 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar.

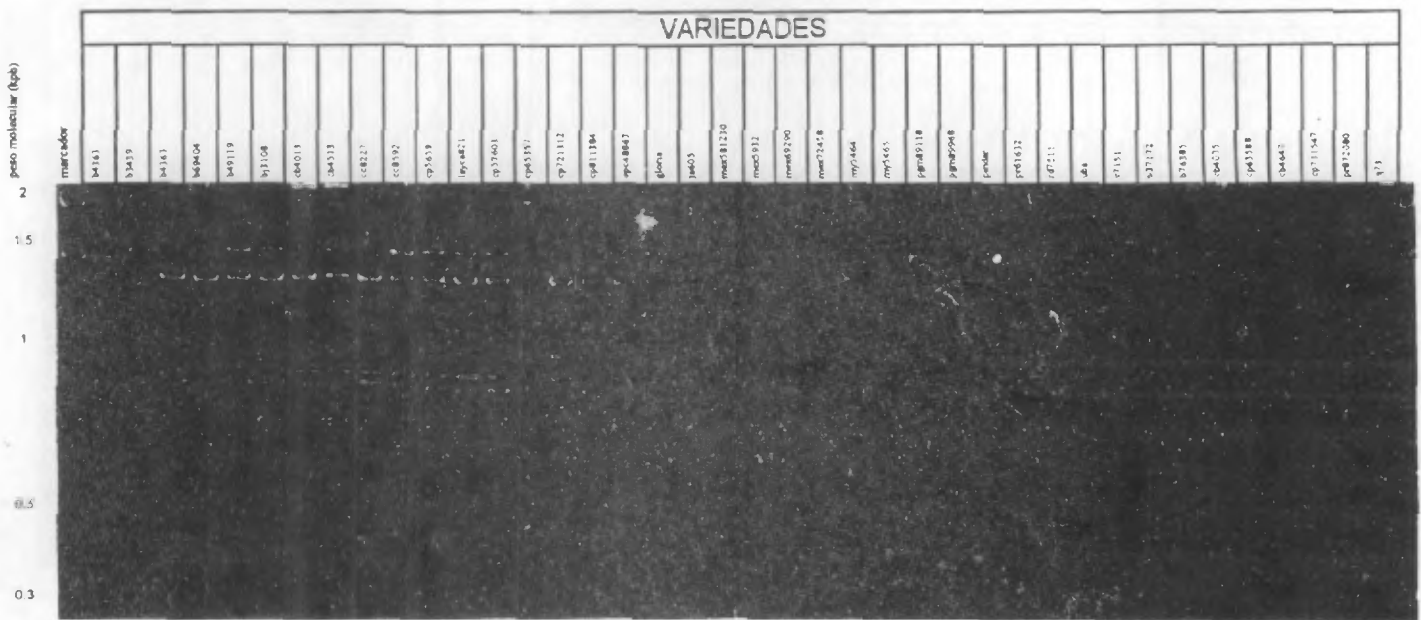


Figura 11. Fotografía que muestra los patrones de bandas generadas por el iniciador OPB-7 para describir la variabilidad de 39 materiales de caña de azúcar.

Tabla 2. Número de fragmentos polimórficos por iniciador

Iniciador OP-	Número de fragmentos polimórficos
AC-5	8
AC-1	8
B-7	7
AB-11	7
C-19	6
AB5	6
B-1	5
C5	2
B-5	2
A1	2
D-3	1
C13	1
B19	1
B11	1
A4	0 (no incluido en el estudio)
TOTAL	57
PROMEDIO POR INICIADOR	4

El promedio de marcadores polimórficos por primer da una idea de la eficiencia de los iniciadores utilizados para detectar polimorfismo. Siendo que el promedio de marcadores por iniciador obtenido es mayor que el mostrado en un estudio precedente realizado por Sánchez (35) en clones de caña de azúcar de similar procedencia que los clones objeto del presente trabajo, los iniciadores utilizados se consideran como adecuados para la detección de polimorfismos. Aunque pareciera que los iniciadores utilizados por Nair (30) son más eficientes en la detección de polimorfismo, hay que tomar en cuenta que los materiales por él analizados pertenecían a cuatro especies diferentes, por ende el polimorfismo es mayor. Los materiales incluidos en este estudio proceden de *S. officinarum* y *S. spontaneum*.

8.3. EVALUACIÓN DEL GRADO DE SIMILITUD ENTRE CLONES

Con la información de la matriz presencia-ausencia y haciendo uso del índice de Dice (37), se obtuvieron valores de similitud con los cuales se construye la matriz de similitud (anexo 5), en la cual se enlistan todas las comparaciones posibles entre variedades.

El promedio general de similitud de 75.6% (distancia relativa 24.6) (tablas 3 y 4) describe a un conjunto muy homogéneo. Comparando el promedio de similitud obtenido y el de los otros cultivos puede verse que la variabilidad de la caña de azúcar y específicamente las variedades analizadas se comporta como la de aquellos que han sido sometidos a procesos de mejoramiento más intensivos.

Este índice de similitud es mayor que el obtenido por Sánchez *et al.* (35) y ligeramente menor que el obtenido por Nair *et al.* (30) (tabla 1) en los clones de *S. officinarum*. La pequeña diferencia entre los resultados aquí expuestos y los reportados por Sánchez *et al.* (35) pueden deberse a la diferencia de origen de las variedades que se analizaron.

Las variedades MEX69290 y CP65357 se encuentran a una distancia de 72.41 (similitud 27.59%), siendo de esta manera, los dos genotipos más alejados genéticamente. El valor de similitud más alto, 93.88%, se presenta entre las variedades B4363-CB4035 y CB4513-CB4035.

El conjunto de valores de similitud más bajos corresponden a la variedad CP65357 con un promedio de 40.57% (tabla 4). Lo cual la hace la variedad más diferente de todas. Estos resultados presentan un rango de similitud más amplio que el reportado por Harvey *et al.* (1994) que va de 71.82% a 89.73%.

Tabla 3. promedio de similitudes entre variedades

VARIEDAD	INDICE PROMEDIO DE SIMILITUD (%)
cp65357	40.57
my5465	62.21
my5464	68.35
b76385	68.47
cp63588	68.94
rd 7511	69.38
Mex 581230	71.54
Mex69290	71.89
Mex5932	72.44
q73	73.02
Uba	73.79
Pgm89118	74.56
cp811384	74.66
Mex72458	75.34
cp721312	75.59
gloria 57	76.72
cp57603	76.97
pgm89968	77.09
cc8592	77.09
pr872080	77.26
v7151	77.39
b49119	77.93
cc8227	78.11
pr61532	78.44
ja 605	78.58
pindar	78.69
cp721312	78.93
b3439	79.20
cb4647	79.35
b37172	79.56
b69404	80.03
layca82172	80.37
cb4013	80.54
epc48863	81.09
b4363	81.29
b4363	81.29
cb4513	81.34
cb4035	81.45
cp5659	81.66
bj3108	82.94

Tabla 4. Estadísticas generales de los valores de similitud

PROMEDIO GENERAL	75.6%
VALOR MINIMO ENTRE LAS VARIEDADES MEX69290 Y CP65357	27.59%
VALOR MÁXIMO ENTRE LAS VARIEDADES B4363-CB4035 Y CB4035-CB4513	93.88%
PROMEDIO DE LA VARIEDAD CON VALORES MÁS BAJOS CP65357	40.57%

El anexo 3 muestra las características fenotípicas tomadas en consideración en las evaluaciones de 4 zafras consecutivas. Al comparar las variedades más cercanas se tiene que son muy similares en las características descritas. Entre las variedades B4363 y CB4035, de las 17 características hay coincidencia en alto grado en 11 de ellas. La mayoría de las coincidencias se refieren a los aspectos morfológicos y de productividad. Las diferencias se encuentran en cuanto a la floración y la susceptibilidad a las enfermedades. La variedad B4363 floreció sólo en algunas ocasiones mientras que la CB4035 florecio siempre. La variedad B4363 es resistente a la mancha amarilla y a la mancha purpura, mientras la CB4035 es susceptible. La variedad B4363 es altamente susceptible al mosaico y a la roya mientras que la CB4035 muestra una susceptibilidad muy baja.

Al comparar las características de la variedades más alejadas, CP65357 y MEX 69290, se tiene que de 10 características fenotípicas (de las que se cuenta con datos) coinciden en 8. Las únicas diferencias las constituyen el peso de los tallos y la floración. Como puede verse la variabilidad fenotípica no siempre concuerda con la variabilidad genotípica.

En un programa de mejoramiento, la heterosis y la variabilidad combinatoria son factores muy importantes. La probabilidad de encontrar heterosis disminuye cuando aumenta la similitud entre los progenitores. Sin embargo este principio no es absoluto, pues es posible encontrar un nivel de heterosis utilizable en genotipos muy cercanos. Además se debe tomar en consideración que la medida de la similitud es relativa al tipo y número de marcadores que se utilice.

En el programa de mejoramiento de CENGICAÑA en 1,997 se utilizó a las variedades CB4647 y CP57603 como progenitores, las cuales muestran un índice de similitud de 78.05%. De este cruzamiento se obtuvo un alto nivel de heterosis en la progenie. Luego de un riguroso proceso de selección, se obtuvo 3 variedades promisorias que actualmente están siendo evaluadas (comunicación personal de Werner Ovalle⁴). Esto representa un claro ejemplo de que es posible encontrar variabilidad combinatoria aún en poblaciones muy homogéneas.

La ventaja que representa la utilización de marcadores moleculares frente a la caracterización fenotípica es clara, pues puede conocerse con mayor certeza la variabilidad existente, lo cual permite hacer una mejor selección de los progenitores de acuerdo a los objetivos que el programa de mejoramiento requiera. Sin embargo, para hacer más eficiente un programa de mejoramiento, es necesario combinar la información acerca de las características fenotípicas con la información obtenida al utilizar los marcadores moleculares.

8.4. OBTENCIÓN DE LA DISTANCIA GENÉTICA ENTRE CLONES

Luego de obtener los valores de similitud se procedió a calcular las distancias genéticas. Con esta información se contruyó una matriz de distancias (anexo 6). Para poder visualizar e interpretar de una mejor manera la información obtenida se procedió a generar un fenograma (figura 12) el cual muestra a las variedades y las agrupaciones que se pueden formar según su distancia genética. La escala va de 0 a 25, siendo el valor 0 para variedades iguales y 25 para variedades totalmente diferentes.

⁴ Coordinador del Área de fitopatología del programa de variedades de CENGICAÑA

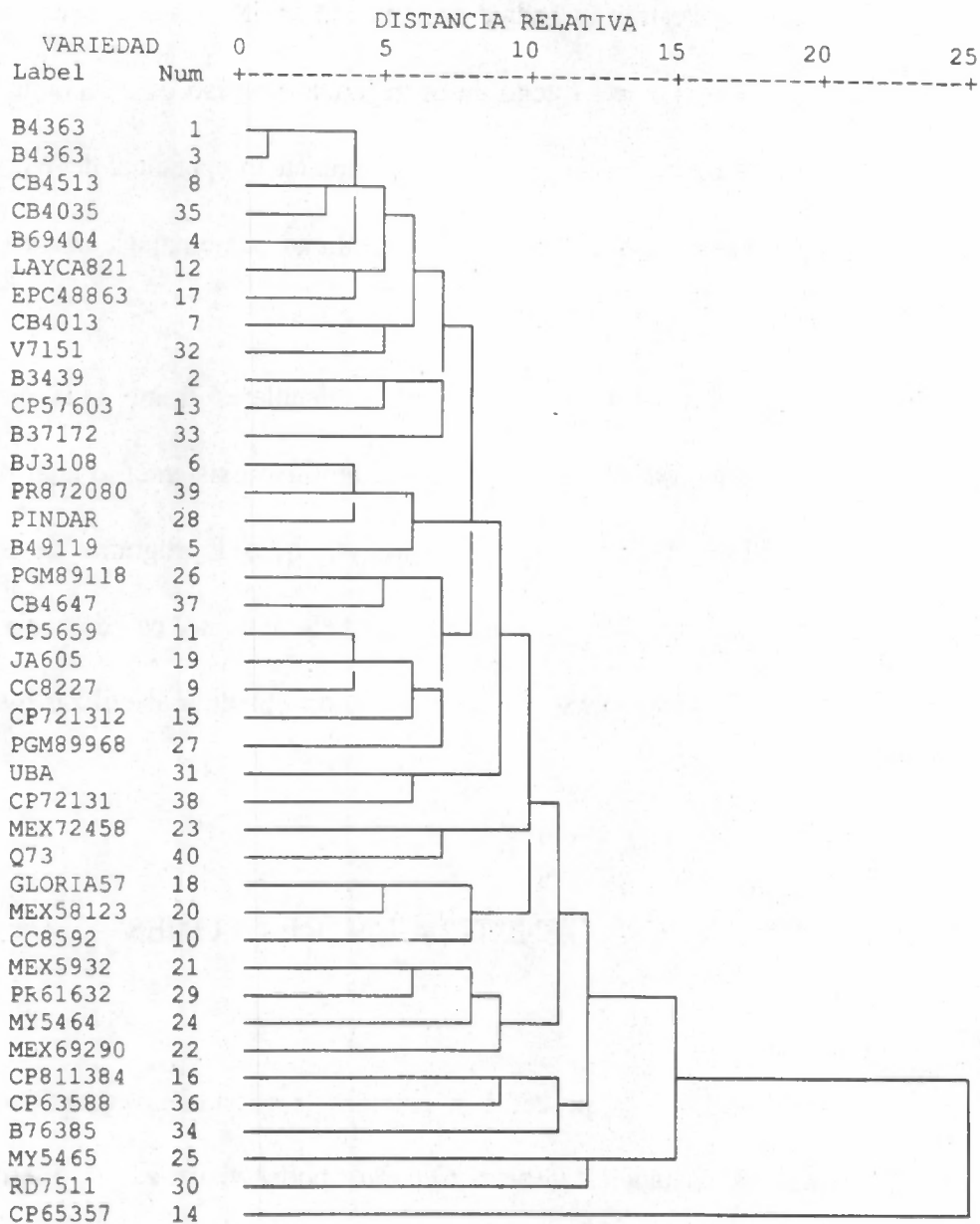


Figura 12. Fenograma generado a partir de matriz de distancias utilizando el método de ligamiento promedio el cual indica la distancia relativa promedio entre los grupos formados.

Al realizar particiones en diferentes niveles del fenograma, se obtienen dos tipos de conglomerados, unos formados por muy pocas variedades y otro que aglutina al resto. Al realizar una partición a la altura de 10, lo cual corresponde a un valor promedio de similitud de 60%, se forman 7 grupos (tabla 5) con el mismo patrón, 6 grupos con muy pocas variedades, el que más 4, y un grupo que aglutina a todas las demás. Este tipo de distribución puede deberse a la alta contribución de *S. officinarum* en las variedades que conforman al grupo más numeroso, lo que las hace ser muy similares entre si. La diferencia de las variedades que conforman grupos pequeños, en especial la variedad CP 65357 puede deberse a la contribución de *S. spontaneum*. Al comparar estos grupos con el análisis fenotípico por el método de componentes principales llevado a cabo en CENGICANA se puede observar que existen algunas coincidencias. En la tabla 6 se aprecia primero un solo grupo fenotípico al cual le corresponden dos grupos genotípicos, luego 4 grupos fenotípicos a los cuales les corresponde un solo genotipo. Si dos genotipos son iguales pueden manifestar o no un mismo fenotipo pues el fenotipo está determinado por el genotipo, el ambiente y la interacción del genotipo con el ambiente. Sin embargo, si dos genotipos son distintos no pueden presentar un fenotipo igual, al menos que se trate de un carácter o caracteres poligénicos (dominados por varios genes). Las variables estudiadas en el cluster fenotípico son dominadas por varios genes. Por lo tanto, los resultados aquí obtenidos, a nivel general, concuerdan con el análisis fenotípico.

Tabla 5. Descripción de la agrupación de las variedades según el análisis de conglomerados indicando los 7 grupos y las variedades que estos incluyen

Variedad	Número de conglomerado	Variedad	Número de conglomerado
B	1	Pgm89118	1
B3439	1	Pgm89968	1
B37172	1	Pindar	1
B4363	1	Pr872080	1
B49119	1	Q73	1
B69404	1	Uba	1
Bj3108	1	V7151	1
Cb4013	1	Cc8592	1
Cb4035	1	Gloria	1
Cb4513	1	Mex581230	1
Cb4647	1	Mex5932	2
Cc8227	1	Mex69290	2
Cp5659	1	My5464	2
Cp57603	1	Pr61632	2
Cp721312	1	Cp63588	3
Cp731547	1	Cp811384	3
Ja605	1	B76385	4
Layca82172	1	My 5465	5
Mex72450	1	Rd7511	6
		Cp65357	7

Tabla 6. Coincidencias entre el análisis según marcadores fenotípicos y marcadores RAPDs indicando los distintos grupos en que se separan las variedades

variedad	Grupo fenotípico	grupo genotípico
CP 63588	1	4
CP 811384	1	4
CB 4013	1	1
CP 57603	1	1
CP 731547	1	1
B 4363	3	1
B 49119	3	1
PINDAR	4	1
PR 872080	4	1
CP 5659	4b	1
CP 721312	4b	1

8.5. COMPARACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DETECTADA CON RAPDS Y LA GENEALOGÍA

Al revisar el pedigrí de los materiales (18) es evidente que todos comparten un número reducido de líneas progenitoras las cuales conforman un reservorio genético limitado (cuadro 4). Estas líneas se han cruzado entre sí hasta originar las variedades actuales. Además la homogeneidad de una población crece cuando aumenta el nivel de endogamia pues la probabilidad de compartir genes aumenta.

Cuadro 4. Ancestros de los cuales se originan las 39 variedades en estudio

Black Cheribon
Chunne
Kansar
Kaludai Boothan
Saccharum spontaneum (India)
Rose Bamboo
Banjermasin Hitam
Loethers
Saccharum officinarum
Saccharum spontaneum (Java)
Ashy Mauritius
Saretha
Vellai
Striped Mauritius
Lohaina (checar)

El pedigrí es muy importante pues muestra la razón de la variabilidad y diferencias entre los genotipos. En el anexo 7 se presenta la genealogía(18) de dos variedades (CP65357-B76385) con un bajo índice de similitud (33.33)⁵. Si bien este no es el valor más bajo, ilustra el comportamiento de dos variedades alejadas genéticamente. Nótese que las interacciones (progenitores comunes) son 3, Co421, Co281 y Poj 2364. El anexo 8 ilustra a dos variedades (CP5659-JA605) con alto índice de similitud (92.68) las cuales presentan 7 interacciones. Cabe señalar que la proximidad generacional de las interacciones es directamente proporcional a la similitud de dos variedades. Una interacción entre padres dará un mayor grado de similitud en la progenie que una entre abuelos. En el anexo 9 puede verse una excepción. Dos variedades (CB4013-CB4035) con los mismos padres presentan un índice de similitud (90.2) menor que el ejemplo anterior. Un ejemplo de la misma situación lo reporta Harvey *et al* (19).

⁵ Se utiliza estas variedades como ejemplo por mostrar los índices de similitud más bajos y contar con datos genealógicos. Lo mismo sucede con CP5659 y JA (92.68%similitud).

9 CONCLUSIONES

- 1) La variabilidad de los 39 genotipos en estudio en comparación con la variabilidad encontrada utilizando la técnica de los RAPDs en otras especies es baja, sin embargo está dentro de lo normal para una especie mejorada. En comparación con los resultados obtenidos en otras variedades de caña de azúcar usando la misma técnica, esta variabilidad es muy similar e incluso ligeramente mayor.
- 2) La variedad CP 65357 se diferencia del resto al mostrar el promedio de similitud más bajo (40.57%).
- 3) La similitud entre las variedades contenidas en cada uno de los 7 grupos según el análisis de conglomerados es mayor del 60%.
- 4) Fueron identificados 12 oligonucleotidos que detectan polimorfismo en *Saccharum spp*, los cuales pueden ser útiles en el estudio de la variabilidad de este género.
- 5) La similitud genética encontrada coincide en algunos casos con las relaciones genealógicas de las variedades en estudio. Por lo tanto el pedigrí da una idea de las relaciones genéticas. Sin embargo, no se puede utilizar ampliamente para establecer las relaciones de similitud.

10 RECOMENDACIONES

- 1) Los resultados aquí expuestos pueden ser utilizados directamente en los programas de mejoramiento. Sin embargo, se deberá tener ciertas consideraciones pues las distancias genéticas son relativas al número de marcadores utilizados. Además debe señalarse que no son excluyentes de los resultados obtenidos con las caracterizaciones fenotípicas sino complementarios y deben utilizarse en conjunto con estos según los requerimientos del programa de mejoramiento. Si lo que se pretende es obtener la mayor heterosis posible, entonces se debe utilizar las variedades más alejadas genéticamente, tomando en cuenta su distancia genética relativa a los marcadores RAPDs y la información aportada por el fenotipo. También debe explorarse con las variedades de distancia intermedia y baja, para determinar el comportamiento de los caracteres fenotípicos con relación a los marcadores RAPDs, pues aún con variedades de variabilidad intermedia puede lograrse buenos resultados para el programa de mejoramiento.

- 2) Para tener una mejor información de los progenitores en el programa de mejoramiento de CENGICAÑA es necesario realizar la descripción de la variabilidad que existe en toda la colección de trabajo (156 cultivares).

11 BIBLIOGRAFÍA

- 1) AMADOR P., D. 1995. Micropropagación y análisis de la relación taxonómica de dos especies de zarzaparrilla (*Smilax*), utilizando marcadores RAPDs. Tesis Mag. Sc. Guanajuato, México, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 84 p.
- 2) ALMEIDA, C.G. 1994. Utilizacao de marcadores moleculares gerados com a técnica de PCR na identificacao de variedades e no mapeamento de genes de interesse agronomico em cana-de-acucar. En Seminario de Tecnología Agronómica (6, 1994, Sao Pablo, Brasil). Memoria. Sao Pablo, Brasil, COPERSUCAR. p. 173-177
- 3) AMAYA E., A. et al. 1995. Biología de la caña de azúcar, en el cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Colombia, CENICAÑA. p. 27-35.
- 4) ASOCIACIÓN DE AZUCAREROS DE GUATEMALA. 1999. Informe anual zafra 1998-1999. Guatemala, ASAZGUA. 67 p.
- 5) BRANDEN, C. TOOZE, J. 1991. Introduction to protein structure. Londres, Inglaterra, Garland Publishing. 302 p.
- 6) CASSALETT D., C.; RANGEL J., H. 1995. Biología de la caña de azúcar, in el cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Colombia, CENICAÑA. p 36-58.
- 7) CRONQUIST, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York, EE.UU, Columbia University Press. 1262 p.
- 8) DANIELS, J.; ROACH, B.T. 1987. Taxonomy and evolution, in sugarcane improvement through breeding. Holanda, Elsevier. p. 7-84.
- 9) DAUGROIS, J.H. et al. 1996. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. *Theor Appl Genet* 91:320-326.
- 10) DELLAPORTA, S. et al. 1983. A Plant DNA minipreparation. *Plant. Mol. Biol.* 1:19-21.
- 11) D'HONT, A. et al. 1993. Cytoplasmic diversity in sugar cane revealed by heterologous probes. *Sugar Cane* 1:12-15.
- 12) _____. 1994. A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the andropogoneae tribe. *Genome* 37:222-230.
- 13) _____. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* 250:405-413.
- 14) DUFOUR, P. et al. 1997. Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. *Theor Appl Génet* 94:409-418
- 15) EKSOMMTRAMAGE, T. et al. 1992. Utility of isozymes in sugar cane breeding. *Sugar Cane* 3: 14-21

- 16) GLASZMANN, J.C. et al. 1989. Biochemical genetic markers in sugarcane. *Theor Appl Genet* 78:537-543.
- 17) GRIVERT, L. et al. 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics (EE.UU.)* 142:987-1000.
- 18) GRUPO DE PAISES LATINOAMERICANOS Y DEL CARIBE EXPORTADORES DE AZUCAR. 1984. Manual de información sistematizada sobre variedades de caña de azúcar y especies afines; versión preliminar. México. 425 p.
- 19) HARVEY, M. et al. 1994. Use of the polymerase chain reaction (PCR) and random amplification of polymorphic DNAs (RAPDs) for the determination of genetic distances between 21 sugarcane varieties. En Congress of South African Sugar Technologist Association (68, 1994, Durban-Mount Edgecombe). Proceedings. Sudáfrica, Kohler Carton. p. 36-40.
- 20) _____. 1996. PCR-based methodologies for fingerprinting sugarcane. En Congreso de International Society of Sugar Cane Technologists (22, 1995, Cartagena, Colombia). Proceedings. Cali, Colombia, TECNICAÑA. p 418-422.
- 21) HEINZ, D.J. 1969. Isozyme prints for variety identification. *International society of sugar cane technologist. Sugar Cane Breeders Newsletter* 24:8.
- 22) HUI L., B. 1998. *Statistical Genomics*. New York, EE.UU, CRC. 611 p.
- 23) JOHNS, M. A. et al. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile Based on RAPD and morphological data. *Crop Science* 37:605-613.
- 24) KORNBERG, A. 1970. La síntesis del ADN. *En La célula viva; selecciones de scientific american*. 2 ed. Madrid, España, Blume.. p 223-242.
- 25) LEHNINGER, A. 1982. *Principles of biochemistry*. New York, EE.UU, Worth , 1013 p. .
- 26) LU, Y.H. et al. 1994. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. *Euphytica (Holanda)* 78:7-18.
- 27) _____. 1994. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. *Euphytica (Holanda)* 78:217-226.
- 28) MUDGE, J. et al. 1996. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. *Crop Science* 36:1362-1366.
- 29) MULLIS, K.B. et al. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology (EE.UU)*. 155:335-350.
- 30) NAIR, V. N. et al. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution (Holanda)* 46:73-79.

- 31) NIRENBERG, M. W. 1970. La clave genética: II. En La célula viva; selecciones de scientific american. 2 ed Madrid, España, Blume. p 212-223.
- 32) POWELL, W. et al. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. Molecular Breeding (Belgica) 2: 225-238.
- 33) RODRIGUEZ, J.M. et al. 1999. Variation among and within Capsicum species revealed by RAPD markers. Theor Appl Genet 99:147-156.
- 34) RUIZ, A. et al. 1983. Peroxidase isoenzymes analysis. En Congreso de Interntional Society of Sugar Cane Technologist (18, 1983, La Habana, Cuba). Proceedings. La Habana, Cuba, ISSCT. p. 437-442.
- 35) SANCHEZ, A.; CASSALETT, C. 1997. Caracterización molecular de variedades de caña de azúcar: una aproximación a la identificaicón de materiales en campo. En Congreso Colombiano de la Asociación de Técnicos de la caña de Azúcar (4, 1997, Cali, Colombia). Memoria. Cali, Colombia, TECNICAÑA. p. 11-17
- 36) SANTOS, J.B. Dos et al. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among Brassica oleracea L. genotypes. Theor Appl Genet 87:909-915.
- 37) SPSS 9.0. En : Dice simmilarity index. EE. UU. [Disco compacto]. 1999. EE.UU., SPSS Inc. 1 Disco compacto.
- 38) TREJOS ZELAYA, J. 1998. Principios de análisis multivariado de datos y clasificación automática. Guatemala. Universidad del Valle. p. 170.
- 39) VILLAND, J. et al. 1998. Genetic variation among tomato accesions from primary and secondary centers of diversity. Crop science 38:1339-1347.
- 40) WATSON, J.D. et al. 1986. ADN recombinante. Trad. Por Enrique Cerdá Olmedo. Barcelona, España. Labor. 208 p.
- 41) _____. 1987. Molecular biology of the gene. California, EE.UU., Benjamin/Cummings. 1163 p.
- 42) WILLIAMS, JG. et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535.

Vo. 130
Petrucci



12 ANEXOS

Anexo 1. Agrupación de 144 variedades según análisis cluster respecto a variables fenotípicas

VARIEDAD	No. DE CLUSTER
B 3439	I
B 37172	
B 69404	
B 69404	
B 69613	
B 70345	
C 11667	
CB 4013	
CB 4513	
CC 8215	
CC 8226	
CC 8227	
CC 8228	
CC 8475	
CC 8592	
CL 61620	
CP 5659	
CP 5659	
CP 57603	
CP 63588	
CP 63588	
CP 65357	
CP 721210	
CP 721312	
CP 731547	
CP 751082	
CP 782114	
CP 811384	
CP 871491	
CP 881066	
CP 881508	
CP 881540	
CP 881696	
CP 881703	
CP 891868	
KIE	
L 6840	
L 7812	
L 7921	
L 79321	
L 8042	
L 8254	
Mex581230	
MEX 5932	
MEX 60430	
MEX 68200	
MEX 69290	
MEX 73206	
MEX 73523	
MEX 741409	
MEX 79431	
B 47258	
B 70351	
B 70515	
B 7052	
B 76345	
CB 4035	
CB 4647	
CO 997	
CP 27139	

VARIEDAD	No. DE CLUSTER
CP 891702	II
L 8009	
L 805B	
L 8116	
MEX 50471	
MEX 60445	
MY 5464	
MY 5465	
PGM 89968	
PR 62626	
PR 62626	
PR 783025A	
CB 4077	
CO 270	
MEX 57351	
MEX 67351	III
MEX 67351	
MEX 67351	
NA 5642	
POJ 2878	
L 8038	
MEX 57683	
MEX 60207	IV
PINDAR .	
PR 872080	
PR 902	
RD 7511	
TUC 6819	
EROS	V
F 145	
M 3145	
PGM 89118	
B 4363	
BJ 3108	VI
Mex 59430	VII
B 74447	VIII
JA 605	
MEX 742400	
B 49119	IX
L 6628	X
L 8104	
MEX 72458	XI
B 76385	XII
EPC 48863	
GLORIA 57	XIII

Anexo 2. Listado de las 39 variedades incluidas en el estudio

No.	VARIEDAD
1	B37172
2	b3439
3	b4363
4	b49119
5	b69404
6	B76385
7	bj3108
8	cb4013
9	CB4035
10	cb4513
11	CB4647
12	cc8227
13	cc8592
14	cp5659
15	cp57603
16	cp63588
17	cp65357
18	cp721312
19	cp731547
20	cp811384
21	epc48863
22	gloria
23	ja
24	layca82172
25	mex581230
26	mex5932
27	mex69290
28	mex72458
29	my5464
30	my5465
31	pgm89118
32	pgm89968
33	pindar
34	pr61632
35	pr872080
36	q73
37	rd7511
38	Uba
39	v7151

Anexo 3. Evaluación fenotípica de algunos de los 39 clones durante 4 zafras consecutivas a partir de 1993

No.	Variedad	PRODUCCION		AGRONOMICAS					ENFERMEDADES ***						CALIFICACION GENERAL ****			
		Azúcar lb/ton	Peso/Lbs 10tallos	Flor *	corcho %	Pobl.** m	Diam. Mm	Alt cm	C	MA	ESC	Mo	R	MP	Hábito c	Grosor tallo	Deshoje	Aspecto general
1	B 3439	190	24	no	0	2.8	23	340		3		-		-	5	4	5	4
2	B 4363	226	40	si/no	0	3.6	26	282	4.9	--	-	77	10/8		3	4	4	3
3	B 49119	225	34	no	0	5.1	28	298	25.9				1/1 -	3		4	5	5
4	BJ 3108	224	43	sino	0	4.1	27	320	--			9	1/1		4	2	2	3
5	CB 4013	230	48	no/si	15.4	4.6	32	350	6.4	4 -			15/8	4 -		2	2	3
6	CB 4035	236	46	si	3.7	2.3	29	302	2	3		6	1/3	4	5	3	5	5
7	CB 4513	234	40	no	0	2.8	26	368		-		--			3	2	3	3
8	CB 4647	228	36	no	0	2.8	32	335	-	4			1/3	2	3	2	4	3
9	CC 8227	230	34	sino	9.5	6.1	27	320		--					1	2	1	2
10	CP 5659	174	36	si	17.2	2.9	28	328			-		1/5	-	5	4	3	3
11	CP 57603	231	56	sino	0	4	36	322	54.8				5/6	3	1	1	2	2
12	CP 63588	231	25	si	5.9	4.2	29	276	4.7 -			11			3	2	4	3
13	CP 65357	229	25	si	41.1	4.6	27	269	19.2			-	5/8	-		2	3	2
14	CP-721312	174	30	si/no	50	2.8	23	231	-	2	-	48	1/5	-	2	2	3	2
15	CP-811384	230	42	si	33	3.1	29	253			13			1	4	3	3	3
16	EPC 48863	175	38	si	0	4.4	32	370					1/3	2 -	2	3	5	4
17	Gloria 57	223	30	si	0	1.3	31	385	-		-		1/5	1	2	2	5	3

No.	Variedad	PRODUCCION		AGRONOMICAS					ENFERMEDADES ***						CALIFICACION GENERAL ****			
		Azúcar lb/ton	Peso/Lbs 10tallos	Flor *	% corcho	Pobl.** m	Diam. Mm	Alt cm	C	MA	ESC	Mo	R	MP	Hábito c	Grosor tallo	Deshoje	Aspecto general
18	Ja 605	229	30	no/si	27.1	1.9	28	313					10/8		4	3	5	5
19	Mex 581230	222	38	no	5.6	2.4	29	337					5/8	1	2	3	4	2
20	Mex 5932	226	4	no	4.5	2.7	32	338	6		-		5/5	3 -	5	4	4	4
21	Mex-69290	223	40	no/si	6.7	1.1	32	330			-			-	3	2	3	3
22	My 5465	176	56	no/si	0	5.8	30	377		2 -			1/5	1	4	2	3	3
23	My-5464	227	38	si/no	6.5	9.9	26	337			2		15/8	4	3	3	5	4
24	PGM-89118			si														
25	PGM-89968			no														
26	PINDAR	228	30	no/si	9.4	5.2	37	355	16		-		1/5	3	3	2	5	3
27	PR-61632	177	48	no/si	0	2.5	31	375		2 -	-		1/2	5 -	2	3	2	2
28	Q 73	232	32	no/si	0	3.5	28	337	68.1			51.9	5/5	-	3	3	5	4
29	RD-7511																	
30	UBA	230	28	si/no	19.3	4.1	31	313	19.2			8			2	2	5	3

* No o Si = constantemente en 4 zafras

Si/No = en algunos años florea otros no, 3:1; No/Si = en algunos años no florea en otros si, 3:1.

** Pobl. = Número de tallos por yema germinada

*** Enfermedades: C=Carbon, MA=Mancha amarilla, ESC=Escaldadura, YLS=Yelow leaf syndrome,

Mo=Mosaico, R=Roya,

MP=Mancha purpura, PB=Pokka

Boeng.

**** Escala de 1 a 5; A= lo mejor, lo peor

VARIEDAD

INICIADOR	DISTANCIA (mm)		PESO MOLECULAR (Kpb)
	7	8	
B4363	1	1	
b3439	1	1	
b4363	1	1	
b69404	1	1	
b49119	1	1	
bj3108	1	1	
cb4013	1	1	
cb4513	1	1	
cc8227	1	1	
cc8592	1	1	
cp5659	1	1	
layca821	1	1	
cp57603	1	1	
cp65357	1	1	
cp721312	1	1	
cp811384	1	1	
epc48863	1	1	
gloria	1	1	
ja605	1	1	
mex581230	1	1	
mex5932	1	1	
mex69242	1	1	
mex72450	1	1	
my5464	1	1	
my5465	1	1	
pgm89118	1	1	
pgm89968	1	1	
pindar	1	1	
pr61632	1	1	
rd7511	1	1	
uba	1	1	
v7151	1	1	
b37172	1	1	
b76385	1	1	
cb4035	1	1	
cp63588	1	1	
cb4647	1	1	
cp731547	1	1	
pr872080	1	1	
q73	1	1	
7	1.4	1.4	
15	1.05	1.05	
17	0.98	0.98	
21	0.78	0.78	
22	0.79	0.79	
27	0.68	0.68	
37	0.44	0.44	
B5	1500	1500	
14	1.08	1.08	
16	1000	1000	
22	0.79	0.79	
23	0.77	0.77	
9	24	0.74	
13	8	1.4	
19	3	1.78	
11	6.5	1.56	
5	11	1.45	
	12	1.15	

Anexo 5. Matriz de similitudes en la cual se toman en cuenta todas las comparaciones posibles entre variedades

	b4363	b3439	b4363	b69404	b49119	bj3108	cb4013	cb4513	cc8227	cc8592	cp5659	layca82172	cp57603	cp65357
B4363		80.85	100.00	91.67	83.72	86.96	88.00	91.67	83.72	78.26	88.89	89.80	82.61	40.00
B3439	80.85		80.85	85.11	85.71	88.89	89.80	85.11	80.95	84.44	86.36	79.17	88.89	47.06
B4363	100.00	80.85		91.67	83.72	86.96	88.00	91.67	83.72	78.26	88.89	89.80	82.61	40.00
B69404	91.67	85.11	91.67		88.37	86.96	88.00	91.67	83.72	73.91	84.44	85.71	78.26	45.71
B49119	83.72	85.71	83.72	88.37		87.80	80.00	83.72	78.95	73.17	85.00	81.82	82.93	40.00
bj3108	86.96	88.89	86.96	86.96	87.80		91.67	91.30	87.80	86.36	88.37	85.11	81.82	48.48
Cb4013	88.00	89.80	88.00	88.00	80.00	91.67		92.00	84.44	87.50	80.85	82.35	83.33	43.24
Cb4513	91.87	85.11	91.67	91.67	83.72	91.30	92.00		83.72	76.26	84.44	89.80	78.26	45.71
Cc8227	83.72	80.95	83.72	83.72	78.95	87.80	84.44	83.72		78.05	90.00	81.82	78.05	40.00
Cc8592	78.26	84.44	78.26	73.91	73.17	86.36	87.50	78.26	78.05		83.72	76.60	81.82	36.36
Cp5659	88.89	86.36	88.89	84.44	85.00	88.37	80.85	84.44	90.00	83.72		86.96	88.37	43.75
layca82172	89.80	79.17	89.80	85.71	81.82	85.11	82.35	89.80	81.82	76.60	86.96		80.85	44.44
Cp57603	82.61	88.89	82.61	78.26	82.93	81.82	83.33	78.26	78.05	81.82	88.37	80.85		36.36
Cp65357	40.00	47.06	40.00	45.71	40.00	48.48	43.24	45.71	40.00	36.36	43.75	44.44	36.36	
Cp721312	83.72	76.19	83.72	79.07	78.95	87.80	80.00	83.72	84.21	82.93	90.00	88.36	78.05	46.67
Cp811384	84.44	81.82	84.44	84.44	75.00	79.07	80.85	84.44	85.00	74.42	85.71	78.26	74.42	43.75
epc48863	88.89	81.82	88.89	84.44	90.00	88.37	80.85	88.89	80.00	79.07	90.48	91.30	88.37	37.50
glona 57	79.17	80.85	79.17	79.17	79.07	82.61	84.00	75.00	74.42	86.96	80.00	81.83	82.61	40.00
Ja 605	86.36	79.07	86.36	81.82	76.92	85.71	82.61	81.82	92.31	80.95	92.68	84.44	80.95	45.16
mex 581230	69.77	80.95	69.77	74.42	78.95	78.05	80.00	74.42	68.42	78.05	70.00	77.27	73.17	40.00
mex5932	74.42	76.19	74.42	69.77	68.42	82.93	80.00	74.42	73.68	78.05	75.00	72.73	73.17	40.00
mex69290	76.19	78.05	76.19	71.43	70.27	75.00	72.73	76.19	70.27	80.00	82.05	79.07	80.00	27.59
mex72458	82.61	80.00	82.61	78.26	78.05	81.82	83.33	86.96	73.17	81.82	79.07	85.11	81.82	30.30
My5464	70.00	81.54	70.00	65.00	88.57	73.68	66.67	70.00	62.86	68.42	70.27	78.05	63.16	37.04
My5465	63.16	54.05	63.16	57.89	66.67	66.67	60.00	53.16	60.61	61.11	68.57	71.79	61.11	40.00
pgm89118	82.93	75.00	82.93	73.17	72.22	82.05	74.42	73.17	83.33	78.92	89.47	76.19	76.92	42.86
pgm89968	83.72	80.95	83.72	79.07	78.95	87.80	84.44	79.07	89.47	82.93	85.00	77.27	78.05	40.00
pindar	80.95	82.93	80.95	85.71	86.49	90.00	81.82	85.71	81.08	80.00	82.05	83.72	75.00	41.38
Pr61632	86.36	79.07	86.36	81.82	82.05	85.71	78.26	81.82	76.92	78.19	87.80	84.44	80.95	38.71
rd 7511	70.00	66.67	70.00	65.00	62.86	78.95	71.43	75.00	68.57	78.95	75.68	73.17	68.42	44.44
uba	80.95	82.93	80.95	80.95	81.08	85.00	77.27	80.95	75.68	70.00	76.92	74.42	75.00	48.28
V7151	85.71	83.33	85.71	89.80	77.27	80.85	90.20	85.71	77.27	80.85	78.26	80.00	80.85	38.89
B37172	85.11	86.96	85.11	85.11	85.71	88.89	85.71	85.11	80.95	80.00	86.36	87.50	84.44	41.18
B76385	74.42	71.43	74.42	79.07	68.42	68.29	75.56	79.07	73.68	63.41	70.00	77.27	63.41	33.33
Cb4035	93.88	83.33	93.88	89.80	81.82	85.11	90.20	93.88	81.82	80.85	86.96	92.00	85.11	38.89
Cp63588	69.77	76.19	69.77	79.07	68.42	73.17	71.11	74.42	78.95	73.17	75.00	72.73	63.41	40.00
Cb4647	83.72	80.95	83.72	83.72	84.21	92.88	84.44	83.72	84.21	78.05	85.00	81.82	78.05	40.00
Cp721312	83.72	85.71	83.72	79.07	78.95	87.80	80.00	83.72	84.21	78.05	85.00	77.27	78.05	40.00
Pr872080	79.07	85.71	79.07	83.72	84.21	92.68	84.44	83.72	78.95	82.93	80.00	77.27	73.17	40.00
Q73	85.11	73.91	85.11	85.11	80.95	75.58	81.63	80.85	71.43	75.56	77.27	79.17	80.00	35.29

... Continuación del anexo 5.

	cp721312	cp811384	epc48863	gloria 57	ja605	mex581230	mex5932	mex69290	mex72458	my5464	my5465	pgm89116	pgm89968	pindar
B4363	83.72	84.44	88.89	79.17	86.36	69.77	74.42	76.19	82.61	70.00	63.16	82.93	83.72	80.95
b3439	76.19	81.82	81.82	80.85	79.07	80.95	76.19	78.05	80.00	81.54	54.05	75.00	80.95	82.93
b4363	83.72	84.44	88.89	79.17	86.36	69.77	74.42	76.19	82.61	70.00	63.16	82.93	83.72	80.95
b69404	79.07	84.44	84.44	79.17	81.82	74.42	69.77	71.43	78.26	65.00	57.89	73.17	79.07	85.71
b49119	78.95	75.00	90.00	79.07	76.92	78.95	68.42	70.27	78.05	68.57	66.67	72.22	78.95	86.49
bj3108	87.80	79.07	88.37	82.61	85.71	78.05	82.93	75.00	81.82	73.68	66.87	82.05	87.80	90.00
cb4013	80.00	80.85	80.85	84.00	82.61	80.00	80.00	72.73	83.33	66.67	60.00	74.42	84.44	81.82
cb4513	83.72	84.44	88.89	75.00	81.82	74.42	74.42	76.19	86.96	70.00	63.16	73.17	79.07	85.71
cc8227	84.21	85.00	80.00	74.42	92.31	68.42	73.68	70.27	73.17	62.88	60.61	83.33	89.47	81.08
cc8592	82.93	74.42	79.07	86.96	80.95	78.05	78.05	80.00	81.82	68.42	61.11	76.92	82.93	80.00
cp5659	90.00	85.71	90.48	80.00	92.68	70.00	75.00	82.05	79.07	70.27	68.57	89.47	85.00	82.05
layca82172	86.36	78.26	91.30	81.63	84.44	77.27	72.73	79.07	85.11	78.05	71.79	76.19	77.27	83.72
cp57603	78.05	74.42	88.37	82.61	80.95	73.17	73.17	80.00	81.82	63.16	61.11	76.92	78.05	75.00
cp65357	46.67	43.75	37.50	40.00	45.16	40.00	40.00	27.59	30.30	37.04	40.00	42.86	40.00	41.38
cp721312		75.00	90.00	79.07	87.18	78.95	73.68	75.68	78.05	74.29	78.79	83.33	84.21	86.49
cp811384	75.00		76.19	66.67	87.80	60.00	75.00	66.67	74.42	59.46	57.14	73.68	75.00	71.79
epc48863	90.00	76.19		80.00	82.93	75.00	75.00	82.05	88.37	75.68	74.29	78.95	80.00	87.18
gloria 57	79.07	66.67	80.00		77.27	88.37	74.42	76.19	73.91	80.00	68.42	73.17	79.07	80.95
ja 605	87.18	87.80	82.93	77.27		66.67	76.92	73.68	76.19	72.22	70.59	86.49	82.05	78.95
mex 581230	78.95	60.00	75.00	88.37	66.67		63.16	70.27	68.29	74.29	66.67	61.11	73.68	86.49
mex5932	73.68	75.00	75.00	74.42	76.92	63.16		75.68	68.29	80.00	60.61	72.22	73.68	70.27
mex69290	75.68	66.67	82.05	76.19	73.68	70.27	75.68		75.00	76.47	50.00	68.57	64.86	77.78
mex72458	78.05	74.42	88.37	73.91	76.19	68.29	68.29	75.00		63.16	61.11	71.79	73.17	75.00
my5464	74.29	59.46	75.68	80.00	72.22	74.29	80.00	76.47	63.18		73.33	66.67	62.86	76.47
my5465	78.79	57.14	74.29	68.42	70.59	66.67	60.61	50.00	61.11	73.33		64.52	60.61	62.50
pgm89118	83.33	73.68	78.95	73.17	86.49	61.11	72.22	88.57	71.79	66.67	64.52		83.33	74.29
pgm89968	84.21	75.00	80.00	79.07	82.05	73.68	73.68	64.86	73.17	62.86	60.61	83.33		81.08
pindar	86.49	71.79	87.18	80.95	78.95	86.49	70.27	77.78	75.00	76.47	62.50	74.29	81.08	
pr61632	82.05	73.17	87.80	77.27	80.00	66.67	87.18	84.21	76.19	83.33	64.71	81.08	76.92	78.95
rd 7511	80.00	64.86	75.68	70.00	72.22	62.86	68.57	64.71	68.42	68.75	73.33	72.73	68.57	76.47
uba	70.27	76.92	76.92	66.67	68.42	64.86	75.68	61.11	70.00	58.82	50.00	74.29	81.08	77.78
v7151	72.73	73.91	78.26	85.71	75.56	77.27	72.73	74.42	76.60	68.29	56.41	71.43	77.27	79.07
b37172	80.95	72.73	86.36	85.11	79.07	80.95	76.19	78.05	75.56	71.79	64.86	75.00	80.95	82.93
b76385	68.42	75.00	70.00	65.12	66.67	68.42	63.16	59.46	68.29	57.14	60.61	66.67	68.42	70.27
cb4035	86.36	82.61	91.30	81.63	84.44	77.27	72.73	79.07	89.36	73.17	66.67	76.19	81.82	83.72
cp63588	63.16	80.00	65.00	69.77	71.79	63.16	63.16	64.86	68.29	57.14	48.48	66.67	68.42	70.27
cb4647	84.21	70.00	85.00	79.07	82.05	73.68	78.95	70.27	78.05	74.29	66.67	88.89	84.21	86.49
cp721312	73.68	80.00	80.00	69.77	76.92	63.16	73.68	75.88	78.05	57.14	48.48	77.78	84.21	75.68
pr872080	78.95	75.00	80.00	79.07	76.92	78.95	78.95	75.68	73.17	74.29	54.55	72.22	78.95	91.89
q73	71.43	72.73	81.82	80.85	74.42	66.67	61.90	68.29	84.44	81.54	64.86	65.00	71.43	68.29

...Continuación del anexo 5.

	pr61632	rd7511	uba	v7151	b37172	b76385	cb4035	cp63588	cb4647	cp731547	pr872080	q73
b4363	13.64	30.00	19.05	14.29	14.89	25.58	6.12	30.23	16.28	16.28	20.93	14.89
b3439	20.93	33.33	17.07	16.67	13.04	28.57	16.67	23.81	19.05	14.29	14.29	26.09
b4363	13.64	30.00	19.05	14.29	14.89	25.58	6.12	30.23	16.28	16.28	20.93	14.89
b69404	18.18	35.00	19.05	10.20	14.09	20.93	10.20	20.93	16.28	20.93	16.28	14.89
b49119	17.95	37.14	18.92	22.73	14.29	31.58	18.18	31.58	15.79	21.05	15.79	19.05
bj3108	14.29	21.05	15.00	19.15	11.11	31.71	14.89	26.83	7.32	12.20	7.32	24.44
cb4013	21.74	28.57	22.73	9.80	14.29	24.44	9.80	28.89	15.56	20.00	15.56	18.37
cb4513	18.18	25.00	19.05	14.29	14.89	20.93	6.12	25.58	16.28	16.28	16.28	19.15
cc8227	23.08	31.43	24.32	22.73	19.05	26.32	18.18	21.05	15.79	15.79	21.05	28.57
cc8592	23.81	21.05	30.00	19.15	20.00	36.59	19.15	26.83	21.95	21.95	17.07	24.44
cp5659	12.20	24.32	23.08	21.74	13.64	30.00	13.04	25.00	15.00	15.00	20.00	22.73
layca82172	15.56	26.83	25.58	20.00	12.50	22.73	8.00	27.27	18.18	22.73	22.73	20.83
cp57603	19.05	31.58	25.00	19.15	15.56	36.59	14.89	36.59	21.95	21.95	26.83	20.00
cp65357	61.29	55.56	51.72	61.11	58.82	66.67	61.11	80.00	60.00	60.00	60.00	64.71
cp721312	17.95	20.00	29.73	27.27	19.05	31.58	13.64	38.84	15.79	26.32	21.05	28.57
cp811384	26.83	35.14	23.08	26.09	27.27	25.00	17.39	20.00	30.00	20.00	25.00	27.27
epc48863	12.20	24.32	23.08	21.74	13.64	30.00	8.70	35.00	15.00	20.00	20.00	18.18
glona 57	22.73	30.00	33.33	14.29	14.89	34.88	18.37	30.23	20.93	30.23	20.93	19.15
ja 605	20.00	27.78	31.58	24.44	20.93	33.33	15.56	28.21	17.95	23.08	23.08	25.58
mex 581230	33.33	37.14	35.14	22.73	19.05	31.58	22.73	36.64	26.32	36.64	21.05	33.33
mex5932	12.82	31.43	24.32	27.27	23.81	36.84	27.27	36.84	21.05	26.32	21.05	38.10
mex69290	15.79	35.29	38.89	25.58	21.95	40.54	20.93	35.14	29.73	24.32	24.32	31.71
mex72458	23.81	31.58	30.00	23.40	24.44	31.71	10.64	31.71	21.95	21.95	26.83	15.56
my5464	16.67	31.25	41.18	31.71	28.21	42.86	26.83	42.86	25.71	42.86	25.71	38.46
my5465	35.29	26.87	50.00	43.59	35.14	39.39	33.33	51.52	33.33	51.52	45.45	35.14
pgm89118	18.92	27.27	25.71	28.57	25.00	33.33	23.81	33.33	11.11	22.22	27.78	35.00
pgm89968	23.08	31.43	18.92	22.73	19.05	31.58	18.18	31.58	15.79	15.79	21.05	28.57
pindar	21.05	23.53	22.22	20.93	17.07	29.73	16.28	29.73	13.51	24.32	8.11	31.71
pr61632		27.78	21.05	20.00	18.28	33.33	15.56	33.33	12.82	23.08	17.95	25.58
rd 7511	27.78		29.41	31.71	33.33	37.14	26.83	37.14	25.71	37.14	25.71	38.46
uba	21.05	29.41		25.58	21.95	29.73	25.58	24.32	18.92	13.51	18.92	36.59
v7151	20.00	31.71	25.58		16.67	22.73	12.00	22.73	18.18	27.27	22.73	16.67
b37172	16.28	33.33	21.95	16.67		23.81	16.67	28.57	14.29	19.05	19.05	26.09
b76385	33.33	37.14	29.73	22.73	23.81		22.73	26.32	26.32	36.84	36.64	33.33
cb4035	15.56	26.83	25.58	12.00	16.67	22.73		31.82	18.18	22.73	22.73	12.50
cp63588	33.33	37.14	24.32	22.73	28.57	26.32	31.82		31.58	21.05	26.32	33.33
cb4647	12.82	25.71	18.92	18.18	14.29	26.32	18.18	31.58		21.05	15.79	28.57
cp721312	23.08	37.14	13.51	27.27	19.05	36.84	22.73	21.05		21.05		28.57
pr872080	17.95	25.71	18.92	22.73	19.05	36.84	22.73	26.32	15.79	21.05		33.33
q73	25.58	38.46	36.59	16.67	26.09	33.33	12.50	33.33	28.57	28.57	33.33	

Anexo 6. Matriz de distancias en la cual se toman en cuenta todas las posibles comparaciones entre variedades.

	b4363	b3439	b4363	b69404	b49119	bj3108	cb4013	cb4513	cc8227	cc8592	cp5659	layca82172	cp57603	cp65357
b4363		19.15	0.00	8.33	16.28	13.04	12.00	8.33	16.28	21.74	11.1	10.20	17.39	60.00
b3439	19.15		19.15	14.89	14.29	11.11	10.20	14.89	19.05	15.56	13.6	20.83	11.11	52.94
b4363	0.00	19.15		8.33	16.28	13.04	12.00	8.33	16.28	21.74	11.1	10.20	17.39	60.00
b69404	8.33	14.89	8.33		11.63	13.04	12.00	8.33	16.28	26.09	15.5	14.29	21.74	54.29
b49119	16.28	14.29	16.28	11.63		12.20	20.00	16.28	21.05	26.83	15.0	18.18	17.07	60.00
bj3108	13.04	11.11	13.04	13.04	12.20		8.33	8.70	12.20	13.64	11.6	14.89	18.18	51.52
cb4013	12.00	10.20	12.00	12.00	20.00	8.33		8.00	15.56	12.50	19.1	17.65	16.67	56.76
cb4513	8.33	14.89	8.33	8.33	16.28	8.70	8.00		16.28	21.74	15.5	10.20	21.74	54.29
cc8227	16.28	19.05	16.28	16.28	21.05	12.20	15.56	16.28		21.95	10.0	18.18	21.95	60.00
cc8592	21.74	15.56	21.74	26.09	26.83	13.64	12.50	21.74	21.95		16.2	23.40	18.18	63.64
cp5659	11.11	13.64	11.11	15.56	15.00	11.63	19.15	15.56	10.00	16.28		13.04	11.63	56.25
layca82172	10.20	20.83	10.20	14.29	18.18	14.89	17.65	10.20	18.18	23.40	13.0		19.15	55.56
cp57603	17.39	11.11	17.39	21.74	17.07	18.18	16.67	21.74	21.95	18.18	11.6	19.15		63.64
cp65357	60.00	52.94	60.00	54.29	60.00	51.52	56.76	54.29	60.00	63.64	56.2	55.56	63.64	
cp721312	16.28	23.81	16.28	20.93	21.05	12.20	20.00	16.28	15.79	17.07	10.0	13.64	21.95	53.33
cp811384	15.56	18.18	15.56	15.56	25.00	20.93	19.15	15.56	15.00	25.58	14.2	21.74	25.58	56.25
epc48863	11.11	18.18	11.11	15.56	10.00	11.63	19.15	11.11	20.00	20.93	9.5	8.70	11.63	62.50
gloria 57	20.83	19.15	20.83	20.83	20.93	17.39	16.00	25.00	25.58	13.04	20.0	18.37	17.39	60.00
ja 605	13.64	20.93	13.64	18.18	23.08	14.29	17.39	18.18	7.69	19.05	7.3	15.56	19.05	54.84
mex 581230	30.23	19.05	30.23	25.58	21.05	21.95	20.00	25.58	31.58	21.95	30.0	22.73	26.83	60.00
mex5932	25.58	23.81	25.58	30.23	31.58	17.07	20.00	25.58	26.32	21.95	25.0	27.27	26.83	60.00
mex69290	23.81	21.95	23.81	28.57	29.73	25.00	27.27	23.81	29.73	20.00	17.9	20.93	20.00	72.41
mex72458	17.39	20.00	17.39	21.74	21.95	18.18	16.67	13.04	26.83	18.18	20.9	14.89	18.18	69.70
my5464	30.00	38.46	30.00	35.00	31.43	26.32	33.33	30.00	37.14	31.58	29.7	21.95	36.84	62.96
my5465	36.84	45.95	36.84	42.11	33.33	33.33	40.00	36.84	39.39	38.89	31.4	28.21	38.89	60.00
pgm89118	17.07	25.00	17.07	26.83	27.78	17.95	25.58	26.83	16.67	23.08	10.5	23.81	23.08	57.14
pgm89968	16.28	19.05	16.28	20.93	21.05	12.20	15.56	20.93	10.53	17.07	15.0	22.73	21.95	60.00
pindar	19.05	17.07	19.05	14.29	13.51	10.00	18.18	14.29	18.92	20.00	17.9	16.28	25.00	58.62
pr61632	13.64	20.93	13.64	18.18	17.95	14.29	21.74	18.18	23.08	23.81	12.2	15.56	19.05	61.29
rd 7511	30.00	33.33	30.00	35.00	37.14	21.05	28.57	25.00	31.43	21.05	24.3	26.83	31.58	55.56
uba	19.05	17.07	19.05	19.05	18.92	15.00	22.73	19.05	24.32	30.00	23.0	25.58	25.00	51.72
v7151	14.29	16.67	14.29	10.20	22.73	19.15	9.80	14.29	22.73	19.15	21.7	20.00	19.15	61.11
b37172	14.89	13.04	14.89	14.89	14.29	11.11	14.29	14.89	19.05	20.00	13.6	12.50	15.56	58.82
b76385	25.58	28.57	25.58	20.93	31.58	31.71	24.44	20.93	26.32	36.59	30.0	22.73	36.59	66.67
cb4035	6.12	16.67	6.12	10.20	18.18	14.89	9.80	6.12	18.18	19.15	13.0	8.00	14.89	61.11
cp63588	30.23	23.81	30.23	20.93	31.58	26.83	28.89	25.58	21.05	26.83	25.0	27.27	36.59	60.00
cb4647	16.28	19.05	16.28	16.28	15.79	7.32	15.56	16.28	15.79	21.95	15.0	18.18	21.95	60.00
cp721312	16.28	14.29	16.28	20.93	21.05	12.20	20.00	16.28	15.79	21.95	15.0	22.73	21.95	60.00
pr872080	20.93	14.29	20.93	16.28	15.79	7.32	15.56	16.28	21.05	17.07	20.0	22.73	26.83	60.00
q73	14.89	26.09	14.89	14.89	19.05	24.44	18.37	19.15	28.57	24.44	22.7	20.83	20.00	64.71

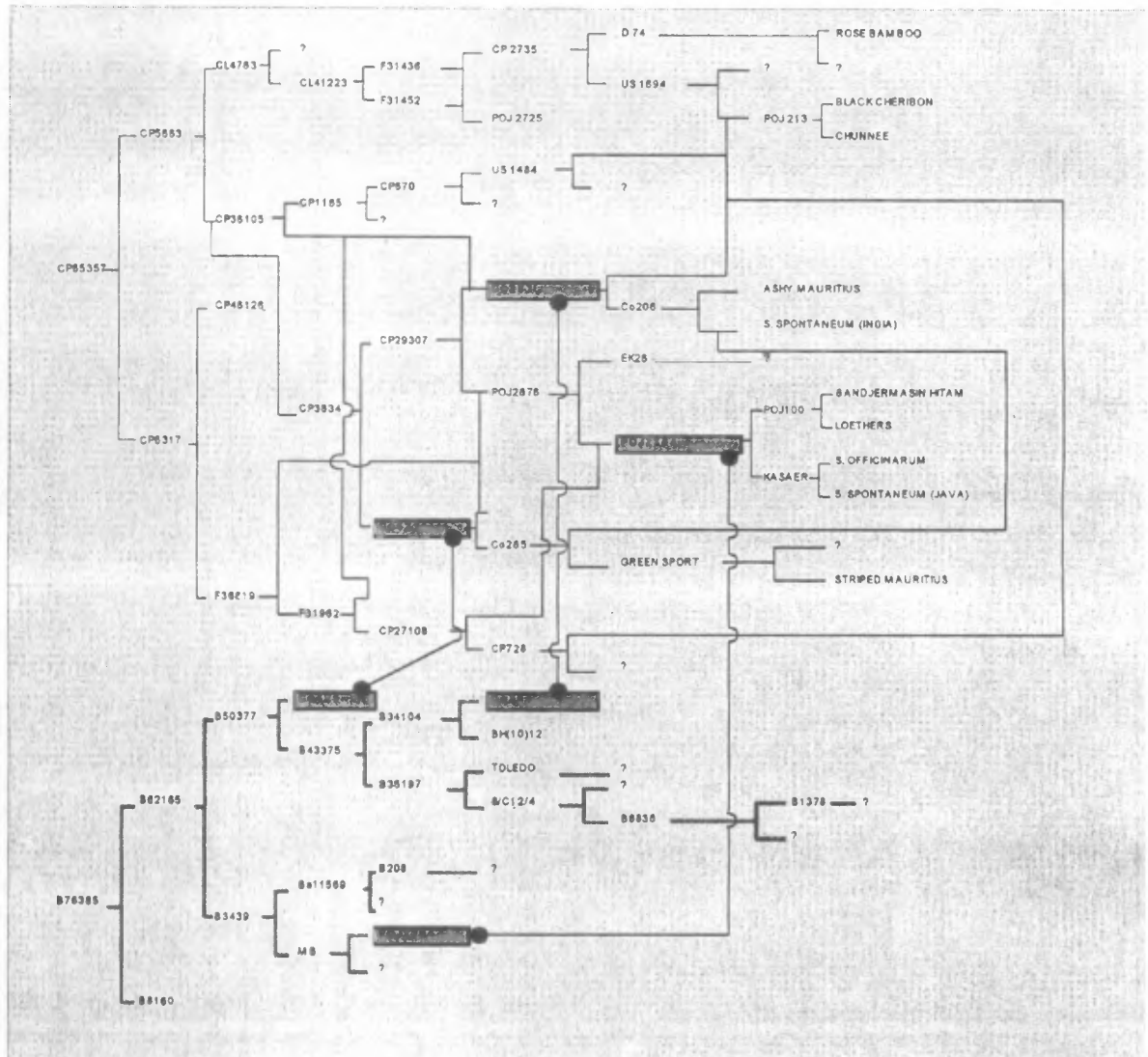
:::Continuación anexo 6.

b4363	16.28	15.56	11.11	20.83	13.64	30.23	25.58	23.81	17.39	30.00	36.84	17.07	16.28	19.05
b3439	23.81	18.18	18.18	19.15	20.93	19.05	23.81	21.95	20.00	38.46	45.95	25.00	19.05	17.07
b4363	16.28	15.56	11.11	20.83	13.64	30.23	25.58	23.81	17.39	30.00	36.84	17.07	16.28	19.05
b69404	20.93	15.56	15.56	20.83	18.18	25.58	30.23	28.57	21.74	35.00	42.11	26.83	20.93	14.29
b49119	21.05	25.00	10.00	20.93	23.08	21.05	31.58	29.73	21.95	31.43	33.33	27.78	21.05	13.51
bj3108	12.20	20.93	11.63	17.39	14.29	21.95	17.07	25.00	18.18	26.32	33.33	17.95	12.20	10.00
cb4013	20.00	19.15	19.15	16.00	17.39	20.00	20.00	27.27	16.67	33.33	40.00	25.58	15.56	18.18
cb4513	16.28	15.56	11.11	25.00	18.18	25.58	25.58	23.81	13.04	30.00	36.84	26.83	20.93	14.29
cc8227	15.79	15.00	20.00	25.58	7.69	31.58	26.32	29.73	26.83	37.14	39.39	16.67	10.53	18.92
cc8592	17.07	25.58	20.93	13.04	19.05	21.95	21.95	20.00	18.18	31.58	38.89	23.08	17.07	20.00
cp5659	10.00	14.29	9.52	20.00	7.32	30.00	25.00	17.95	20.93	29.73	31.43	10.53	15.00	17.95
ca82172	13.64	21.74	8.70	18.37	15.56	22.73	27.27	20.93	14.89	21.95	28.21	23.81	22.73	16.28
cp57603	21.95	25.58	11.63	17.39	19.05	26.83	26.83	20.00	18.18	36.84	38.89	23.08	21.95	25.00
cp65357	53.33	56.25	62.50	60.00	54.84	60.00	60.00	72.41	69.70	62.96	60.00	57.14	60.00	58.62
cp721312		25.00	10.00	20.93	12.82	21.05	26.32	24.32	21.95	25.71	21.21	16.67	15.79	13.51
cp811384	25.00		23.81	33.33	12.20	40.00	25.00	33.33	25.58	40.54	42.86	26.32	25.00	28.21
epc48863	10.00	23.81		20.00	17.07	25.00	25.00	17.95	11.63	24.32	25.71	21.05	20.00	12.82
gloria 57	20.93	33.33	20.00		22.73	11.63	25.58	23.81	26.09	20.00	31.58	26.83	20.93	19.05
ja 605	12.82	12.20	17.07	22.73		33.33	23.08	26.32	23.81	27.78	29.41	13.51	17.95	21.05
mex 581230	21.05	40.00	25.00	11.63	33.33		36.84	29.73	31.71	25.71	33.33	38.89	26.32	13.51
mex5932	26.32	25.00	25.00	25.58	23.08	36.84		24.32	31.71	20.00	39.39	27.78	26.32	29.73
mex69290	24.32	33.33	17.95	23.81	26.32	29.73	24.32		25.00	23.53	50.00	31.43	35.14	22.22
mex72458	21.95	25.58	11.63	26.09	23.81	31.71	31.71	25.00		36.84	38.89	28.21	26.83	25.00
my5484	25.71	40.54	24.32	20.00	27.78	25.71	20.00	23.53	36.84		26.67	33.33	37.14	23.53
my5465	21.21	42.86	25.71	31.58	29.41	33.33	39.39	50.00	38.89	26.67		35.48	39.39	37.50
pgm89118	16.67	26.32	21.05	26.83	13.51	38.89	27.78	31.43	28.21	33.33	35.48		16.67	25.71
pgm89968	15.79	25.00	20.00	20.93	17.95	26.32	26.32	35.14	26.83	37.14	39.39	16.67		18.92
pindar	13.51	28.21	12.82	19.05	21.05	13.51	29.73	22.22	25.00	23.53	37.50	25.71	18.92	
pr61632	17.95	26.83	12.20	22.73	20.00	33.33	12.82	15.79	23.81	16.67	35.29	18.92	23.08	21.05
rd 7511	20.00	35.14	24.32	30.00	27.78	37.14	31.43	35.29	31.58	31.25	26.67	27.27	31.43	23.53
uba	29.73	23.08	23.08	33.33	31.58	35.14	24.32	38.89	30.00	41.18	50.00	25.71	18.92	22.22
v7151	27.27	26.09	21.74	14.29	24.44	22.73	27.27	25.58	23.40	31.71	43.59	28.57	22.73	20.93
b37172	19.05	27.27	13.84	14.89	20.93	19.05	23.81	21.95	24.44	28.21	35.14	25.00	19.05	17.07
b76365	31.58	25.00	30.00	34.88	33.33	31.58	36.84	40.54	31.71	42.86	39.39	33.33	31.58	29.73
cb4035	13.84	17.39	8.70	18.37	15.56	22.73	27.27	20.93	10.64	26.83	33.33	23.81	18.18	16.28
cp63588	36.84	20.00	35.00	30.23	28.21	36.84	36.84	35.14	31.71	42.86	51.52	33.33	31.58	29.73
cb4647	15.79	30.00	15.00	20.93	17.95	26.32	21.05	29.73	21.95	25.71	33.33	11.11	15.79	13.51
cp721312	26.32	20.00	20.00	30.23	23.08	36.84	26.32	24.32	21.95	42.86	51.52	22.22	15.79	24.32
pr872080	21.05	25.00	20.00	20.93	23.08	21.05	21.05	24.32	26.83	25.71	45.45	27.78	21.05	8.11
q73	28.57	27.27	18.18	19.15	25.58	33.33	38.10	31.71	15.56	38.46	35.14	35.00	28.57	31.71

...Continuación anexo 6.

	pr61632	rd7511	uba	v7151	b37172	b76385	cb4035	cp63588	cb4647	cp731547	pr872080	q73
b4363	13.64	30.00	19.05	14.29	14.89	25.58	6.12	30.23	16.28	16.28	20.93	14.89
b3439	20.93	33.33	17.07	16.67	13.04	28.57	16.67	23.81	19.05	14.29	14.29	26.09
b4363	13.64	30.00	19.05	14.29	14.89	25.58	6.12	30.23	16.28	18.28	20.93	14.89
b69404	18.18	35.00	19.05	10.20	14.89	20.93	10.20	20.93	16.28	20.93	16.28	14.89
b49119	17.95	37.14	18.92	22.73	14.29	31.56	18.18	31.58	15.79	21.05	15.79	19.05
bj3108	14.29	21.05	15.00	19.15	11.11	31.71	14.89	26.83	7.32	12.20	7.32	24.44
cb4013	21.74	28.57	22.73	9.80	14.29	24.44	9.80	28.89	15.56	20.00	15.56	18.37
cb4513	18.18	25.00	19.05	14.29	14.89	20.93	6.12	25.58	16.28	16.28	16.28	19.15
cc8227	23.08	31.43	24.32	22.73	19.05	26.32	18.18	21.05	15.79	15.79	21.05	28.57
cc8592	23.81	21.05	30.00	19.15	20.00	36.59	19.15	26.83	21.95	21.95	17.07	24.44
cp5659	12.20	24.32	23.08	21.74	13.64	30.00	13.04	25.00	15.00	15.00	20.00	22.73
layca82172	15.56	26.83	25.58	20.00	12.50	22.73	8.00	27.27	18.18	22.73	22.73	20.83
cp57603	19.05	31.58	25.00	19.15	15.56	36.59	14.89	36.59	21.95	21.95	26.83	20.00
cp65357	61.29	55.56	51.72	61.11	58.82	66.67	61.11	60.00	60.00	60.00	60.00	64.71
cp721312	17.95	20.00	29.73	27.27	19.05	31.58	13.64	36.84	15.79	26.32	21.05	28.57
cp811384	26.83	35.14	23.08	26.09	27.27	25.00	17.39	20.00	30.00	20.00	25.00	27.27
epc48863	12.20	24.32	23.08	21.74	13.64	30.00	8.70	35.00	15.00	20.00	20.00	18.18
gloria 57	22.73	30.00	33.33	14.29	14.89	34.88	18.37	30.23	20.93	30.23	20.93	19.15
ja 605	20.00	27.78	31.58	24.44	20.93	33.33	15.56	28.21	17.95	23.08	23.08	25.58
mex 581230	33.33	37.14	35.14	22.73	19.05	31.58	22.73	36.84	26.32	36.84	21.05	33.33
mex5932	12.82	31.43	24.32	27.27	23.81	36.84	27.27	36.84	21.05	26.32	21.05	38.10
mex69290	15.79	35.29	38.89	25.58	21.95	40.54	20.93	35.14	29.73	24.32	24.32	31.71
mex72458	23.81	31.58	30.00	23.40	24.44	31.71	10.64	31.71	21.95	21.95	26.83	15.56
my5464	16.67	31.25	41.18	31.71	28.21	42.86	26.83	42.86	25.71	42.86	25.71	38.46
my5465	35.29	26.67	50.00	43.59	35.14	39.39	33.33	51.52	33.33	51.52	45.45	35.14
pgm89118	18.92	27.27	25.71	28.57	25.00	33.33	23.81	33.33	11.11	22.22	27.78	35.00
pgm89968	23.08	31.43	18.92	22.73	19.05	31.58	18.18	31.58	15.79	15.79	21.05	28.57
pindar	21.05	23.53	22.22	20.93	17.07	29.73	16.28	29.73	13.51	24.32	8.11	31.71
pr61632		27.78	21.05	20.00	18.28	33.33	15.56	33.33	12.82	23.08	17.95	25.58
rd 7511	27.78		29.41	31.71	33.33	37.14	26.83	37.14	25.71	37.14	25.71	38.46
uba	21.05	29.41		25.58	21.95	29.73	25.58	24.32	18.92	13.51	18.92	36.59
v7151	20.00	31.71	25.58		16.67	22.73	12.00	22.73	18.18	27.27	22.73	16.67
b37172	16.28	33.33	21.95	16.67		23.81	16.67	28.57	14.29	19.05	19.05	26.09
b76385	33.33	37.14	29.73	22.73	23.81		22.73	26.32	26.32	36.84	36.84	33.33
cb4035	15.56	26.83	25.58	12.00	16.67	22.73		31.82	18.18	22.73	22.73	12.50
cp63588	33.33	37.14	24.32	22.73	28.57	26.32	31.82		31.58	21.05	26.32	33.33
cb4647	12.82	25.71	18.92	18.18	14.29	26.32	18.18	31.58		21.05	15.79	28.57
cp721312	23.08	37.14	13.51	27.27	19.05	36.84	22.73	21.05	21.05		21.05	28.57
Pr872080	17.95	25.71	18.92	22.73	19.05	36.84	22.73	26.32	15.79	21.05		33.33
Q73	25.58	38.46	36.59	16.67	26.09	33.33	12.50	33.33	28.57	28.57	33.33	

Anexo 7. Árbol genealógico de las variedades CP 65357 y B 76385 que representan a las variedades más alejadas con un índice de



CP 65357

B 76385

INTERSECCIONES

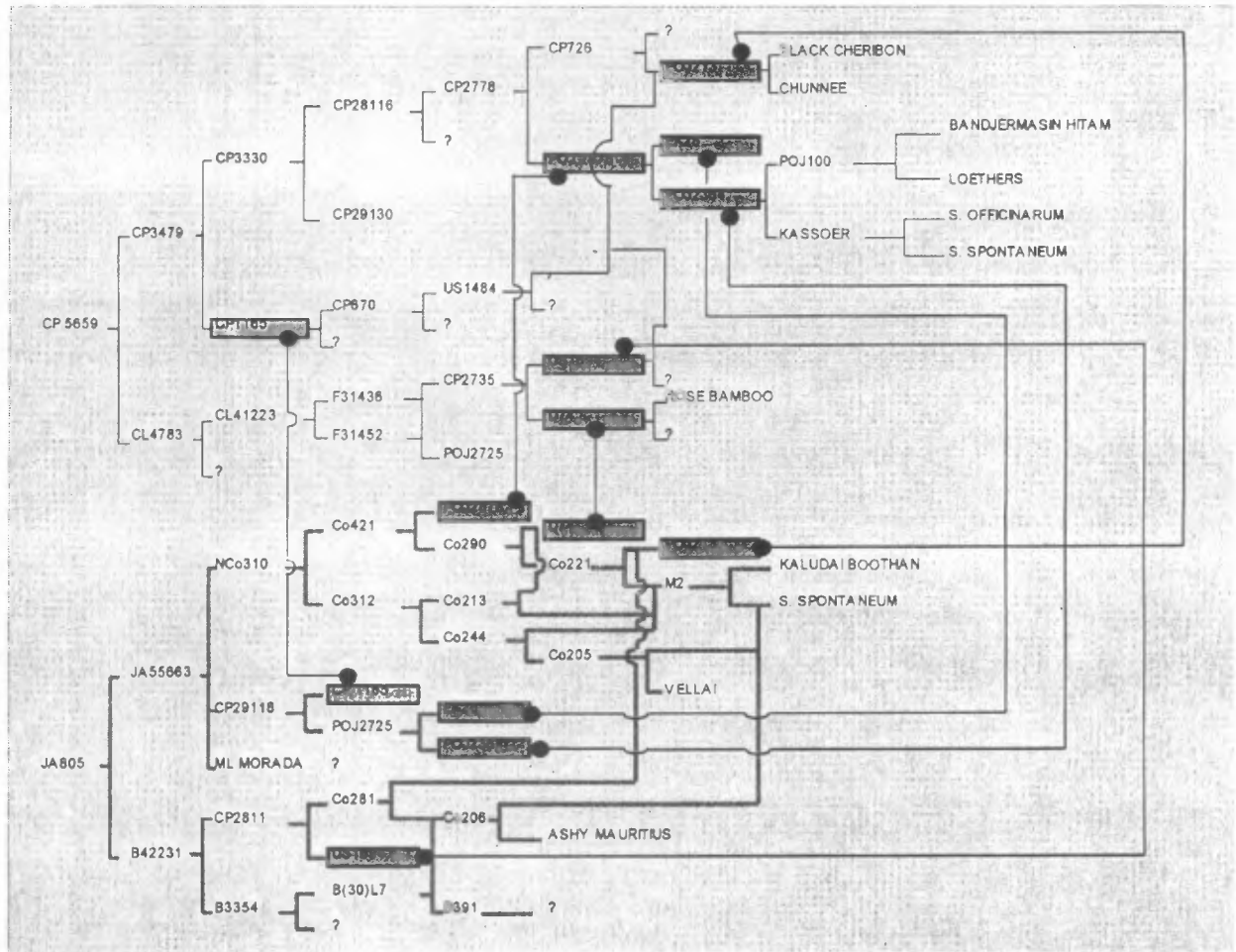
(progenitores comunes =3)



Similitud:

33.33%

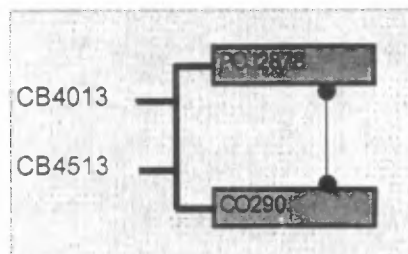
Anexo 8. Árbol genealógico de las variedades CP 5459 y JA 605



Anexo 9. Árbol genealógico de las variedades CB 4013 y CB 4513.

Similitud: 90.2 %

INTERACCIONES: 1





FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "UTILIZACION DE MARCADORES DE ADN POLIMORFICOS AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD) PARA LA DETECCION DE VARIACION GENETICA EN 39 GENOTIPOS DE CAÑA DE AZUCAR".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: LUIS FELIPE LEON SOLARES

CARNET No: 9410056

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Marco Vinicio Fernández Montoya
Ing. Agr. Jorge Omar Samayoa Juárez
Dr. Luis Mejía de León
Dr. Carlos Alfonso Orozco Castillo

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. M.Sc. Domingo Amador Pérez
A S E S O R

Dr. César Augusto Azurdia Pérez
A S E S O R

Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
DIRECTOR DEL IIA.



I M P R I M A S E

Ing. Agr. M.Sc. Edgar Osvaldo Franco Rivera
D E C A N O



cc:Control Académico
Archivo
IIA.
AO/prr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C.A.
TEL/FAX (502) 476-9794
e-mail: llusac.edu.gt & <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>