

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

**“USO DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN POLIMORFICOS  
AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD's) PARA SELECCIONAR PROGENITORES  
EN CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum spp*)”**

**TESIS**

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



**EDGAR IVAN AGUIRRE SOLIS**

**EN EL ACTO DE INVESTITURA COMO  
INGENIERO AGRONOMO**

**EN**

**SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOL  
EN EL GRADO ACADEMICO DE  
LICENCIADO**

**GUATEMALA, JULIO DE 2005**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL  
01  
T(2181)

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**RECTOR**

**Dr. M.V. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA**

**DECANO  
SECRETARIO  
VOCAL PRIMERO  
VOCAL SEGUNDO  
VOCAL TERCERO  
VOCAL CUARTO  
VOCAL QUINTO**

**Dr. Ariel Abderraman Ortiz López  
Ing. Agr. Pedro Peláez Reyes  
Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel Ovalle  
Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle  
Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortiz  
Mep. Juvencio Chom Canil  
Mep. Bayron Geovany González Chavajay**

Guatemala, Mayo de 2005

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

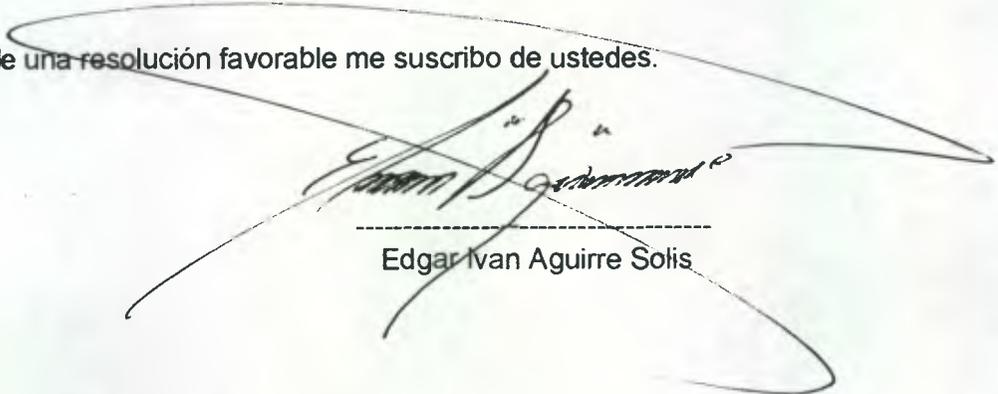
Respetables señores:

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:

“USO DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN POLIMORFICOS AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD`s) PARA SELECCIONAR PROGENITORES EN CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum spp*)”

Trabajo que presento como requisito previo a optar 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.



Edgar Ivan Aguirre Solis

## Tesis que dedico

A:

**DIOS,**

Específicamente, porque día con día bendice y engalana nuestras vidas con su inmenso amor y misericordia. Recibe esto Padre Bendito como una recompensa, pues seguramente, nunca escatimaste esfuerzos para que alcanzara dicho sueño.

**Mis Padres,**

Francisco Javier Aguirre

Marta Solis de Aguirre

Por siempre creer en la grandeza de Dios, por el esfuerzo tesonero dirigido a su familia, que Dios les bendiga y les recompense todo cuanto han hecho.

**Los esposos Colindres Aguirre,**

Porque producto de su matrimonio, hoy por hoy, disfrutamos tanto su semilla. Que Dios los cobije y los fortalezca.

**Mi núcleo familiar,**

Por acompañar mi vida y contribuir en el desarrollo de mi vida personal.

**Mis Amigos,**

Porque hemos compartido cada experiencia y hemos vivido como equipo nuestras alegrías y preocupaciones.

**Mis compañeros Profesionales,**

Que Dios los guíe y que se tracen metas competitivas día con día.

**Mi novia,**

Por ser super especial y respetuosa. Porque con fe en Dios y el ejercicio de tu profesión lograrás desarrollar habilidades poco explotadas en mujeres guatemaltecas.

**Agricultor guatemalteco, y**

**Usted que me acompaña.**

## RECONOCIMIENTO

**A:**

**Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC).**

Por formar profesionales con visión científica-tecnológica y humanística.

Por ser albergue de magnos intelectuales. Docentes de mucha altura.

Porque marcó mi vida, en el ámbito de estudiante y docente auxiliar.

**Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA).**

Por ser institución pionera en la investigación y capacitación agrícola nacional.

Por la integración del equipo multidisciplinario existente.

Por el aval y apoyo para este proyecto de investigación desde su concepción

**Ingenio Pantaleón S.A.**

Por promover el desarrollo tanto de la costa sur como de Guatemala misma.

Por ser empresa líder.

Por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que hicieron posible esta investigación:

Ph. D. Mario Francisco Melgar Morales, director general de CENGICAÑA, por su gran interés y apoyo para el desarrollo de esta investigación y por permitir el desarrollo de su equipo.

Ing. Agr. Msc. Domingo Amador Pérez, por abrir puertas a la investigación biotecnológica y por la asesoría-colaboración en la presente investigación.

Ph. D. José Luis Quemé e Ing. Agr. Werner Ovalle, de CENGICAÑA; Ing. Agr. Amilcar Sánchez y Ph. D. Akio Ueno del Laboratorio de Biotecnología de la FAUSAC; Lic. Maria Eugenia Paredes y Lic Maria Paula de León del laboratorio de Citohistología de la Facultad de Farmacia. Por su incondicional colaboración y asesoría.

Ing. Luis Felipe León, Docente FAUSAC; por la confianza y perseverancia inculcada a través del desarrollo de la presente investigación y porque nunca escatimó esfuerzos para que la presente investigación permitiera enriquecer el conocimiento del material genético existente en la Colección de Trabajo del programa de mejoramiento CENGICAÑA.

Gerencia Pantaleón: Ing. Mauricio Cabarrus, Ing. Julio Cesar Leal, Ing. Jorge Luis Pappa, Ing. Joel García Cuellar por las decisiones acertadas en la dirección de esta importante empresa.

Ingenieros: Gustavo Paredes, Gonzalo Madrid, Carlos Zelada y Omar Tuchán por el impulso brindado en la organización Pantaleón y por su amistad.

A los presentes en los momentos más importantes de esta investigación porque de no ser así, la misma tal vez hubiera cobrado otro rumbo.

## i. CONTENIDO

|  | Página |
|--|--------|
| INDICE DE FIGURAS.....   | iii    |
| INDICE DE TABLAS.....  | iv     |
| INDICE DE CUADROS.....   | v      |
| RESUMEN.....   | vi     |
| 1. INTRODUCCION.....   | 1      |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....                                       | 2      |
| 3. MARCO CONCEPTUAL.....   | 3      |
| 3.1 Taxonomía de la caña de azúcar.....                                  | 3      |
| 3.2 Consideraciones generales de Saccharum.....                          | 3      |
| 3.3 Generalidades del Programa de Mejoramiento en GENGICAÑA.....         | 6      |
| 3.4 Marcadores Genéticos.....  | 8      |
| 3.4.1 Marcadores de ADN Polimórficos Amplificados al Azar (RAPD's).....  | 11     |
| 3.4.1.1 Los Componentes del PCR-RAPD'S.....                              | 15     |
| a) El ADN molde.....   | 15     |
| b) El amortiguador.....  | 17     |
| c) Los desoxirribonucleótidos de trifosfato, dNTPs.....                  | 18     |
| d) Los Oligonucleótidos sintéticos.....                                  | 18     |
| e) La enzima ADN polimerasa.....   | 19     |
| f) El Agua.....  | 20     |
| g) El ciclo térmico.....   | 20     |
| 3.4.1.2 Detección de diferencias entre individuos.....                   | 20     |
| 3.4.1.2.1 Factores que afectan la tasa de migración electroforética..... | 21     |
| a) Dependientes de las moléculas a separar.....                          | 21     |
| b) Dependientes del sistema electroforético.....                         | 21     |
| 3.4.1.3 Tinción de Geles.....  | 22     |
| 3.4.1.4 Análisis e Interpretación de Huellas de ADN.....                 | 23     |
| 3.5 Análisis estadístico en NTSYSpc.....                                 | 23     |
| 4. OBJETIVOS.....  | 25     |
| 4.1 General.....   | 25     |
| 4.2 Específicos.....   | 25     |
| 5. HIPOTESIS.....  | 25     |
| 6. VARIABLES RESPUESTA.....  | 25     |
| 7. METODOLOGIA.....  | 26     |
| 7.1 Fuente y Características del Material Vegetal.....                   | 26     |
| 7.2 Preparación de Cristalería y Equipo.....                             | 27     |
| 7.3 Extracción de ADN utilizando genelute, SIGMA.....                    | 27     |

|   |    |
|---|----|
| a) Los requerimientos para iniciar el proceso de extracción de ADN.....   | 27 |
| b) Proceso de extracción de ADN.....  | 27 |
| 7.4 Cuantificación de Acidos Nucleicos (Determinación Espectofotométrica).....  | 28 |
| 7.5 Preparación de diluciones estándar.....   | 28 |
| 7.6 Determinación de la calidad del ADN en geles de Agarosa.....  | 28 |
| a) Preparación de minigel de agarosa.....   | 28 |
| b) Colocación de las muestras de ADN en el gel.....   | 29 |
| c) Tinción y Observación.....   | 29 |
| 7.7 Procedimiento de Amplificación de Fragmentos de ADN mediante la reacción en Cadena de<br>la Polimerasa (PCR)..... | 30 |
| a) Pasos previos.....   | 30 |
| b) Preparación de reactivos.....  | 30 |
| c) La solución de reacción.....   | 31 |
| d) Ciclo Térmico.....   | 31 |
| e) Consideraciones.....   | 32 |
| 7.8 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa.....                                       | 32 |
| 7.9 Colocación de muestras de ADN en el gel.....  | 32 |
| 7.10 Tinción con Bromuro de Etidio.....   | 33 |
| 7.11 Registro de Datos.....   | 33 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 34 |
| 9. CONCLUSIONES.....  | 38 |
| 10. RECOMENDACIONES.....  | 39 |
| 11. BIBLIOGRAFIA.....   | 40 |
| 12. ANEXOS.....   | 44 |

## ii. INDICE DE FIGURAS

### PAGINA

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.  |    |
| Representación esquemática de la citogenética de los cruces inter-específicos que dieron origen a las variedades actuales de caña de azúcar ( <i>Saccharum spp</i> ).....  | 5  |
| Figura 2.  |    |
| Esquema de selección del programa de variedades de CENGICAÑA.....  | 7  |
| Figura 3.  |    |
| Componentes clave de la mezcla PCR.....  | 12 |
| Figura 4.  |    |
| Análisis esquemático de la técnica RAPD`s.....   | 14 |
| Figura 5.  |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon C-19 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....  | 46 |
| Figura 6.  |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon B-7 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....   | 47 |
| Figura 7.  |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon AC-5 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....  | 48 |
| Figura 8.  |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon AB-11 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s..... | 49 |
| Figura 9.  |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon AB-7 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....  | 50 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 10.   |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon AB-5 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....  | 51 |
| Figura 11.   |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon AA-10 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....   | 52 |
| Figura 12.   |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon A-04 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....  | 53 |
| Figura 13.   |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon A-01 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....  | 54 |
| Figura 14.   |    |
| Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador Operon D-2 y la técnica de marcadores moleculares RAPD`s.....   | 55 |
| Figura 15.   |    |
| Dendrograma de relaciones genéticas de 41 variedades de caña de azúcar generado mediante el análisis de las matrices de presencia-ausencia obtenidas de la amplificación de fragmentos RAPD`s con 10 cebadores de Operon utilizando el programa UPGMA, del paquete NTSYS 2.1. CENGICAÑA..... | 63 |

### iii. INDICE DE TABLAS

#### Tabla 1.

Reactivos empleados en la extracción de ADN (diversas fuentes)..... 16

#### Tabla 2.

Variedades de caña de azúcar a caracterizar por RAPD's. Segunda etapa CENGICAÑA,  
Abril 2001..... 26

### iii. INDICE DE CUADROS

#### Cuadro 1.

Matriz de presencia-absencia generada mediante el análisis de 41 variedades de caña de  
azúcar (*Saccharum spp*) con los 10 iniciadores de Operon.....57

#### Cuadro 2.

Coefficiente de Dice obtenido mediante el análisis de 41 variedades de caña de azúcar  
(*Saccharum spp*). Generado con las matrices de presencia-absencia de los 10 cebadores de  
Operon, Utilizando el programa NTSYS 2.1, CENGICAÑA 2004.....61

**“USO DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN POLIMORFICOS AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD`s) PARA SELECCIONAR PROGENITORES EN CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum spp*)”**

**“THE USE OF MOLECULAR MARKER RAPD`s (Random Amplified Polymorphic DNA) FOR PROGENITORS SELECTION IN SUGAR CANE (*Saccharum spp*)”**

**RESUMEN**

El conocimiento y manejo de la diversidad genética permite ser más eficientes en la combinación de parentales en las hibridaciones. En caña de azúcar existen caracterizaciones morfológicas de las variedades. Sin embargo, en algunos casos la variabilidad analizada puede ser debida a influencias ambientales. Avances recientes permiten la utilización de marcadores moleculares de ADN, que de conjunto con los métodos tradicionales de mejoramiento constituye una vía poderosa para acelerar el conocimiento genético y evitar la influencia del medio ambiente. Por ello, CENGICAÑA conjuntamente con la FAUSAC realizó una evaluación de 41 variedades provenientes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando Marcadores de ADN Polimórficos Amplificados al Azar (RAPD`s, Randomly Amplified Polymorphic DNA) a fin de identificar progenitores que definan cruzamientos más exitosos.

La estandarización de la técnica en la presente evaluación permitió la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) de 10 cebadores o iniciadores de Operon, mostrando en las 41 variedades analizadas un promedio 28 bandas polimórficas/iniciador, para un total de 275 en los iniciadores amplificados y “cero bandas” en las muestras testigo. Al polimorfismo encontrado se le practicó un análisis multivariado utilizando el programa NTSYS-pc que calculó el coeficiente de Dice en cada variedad con respecto al resto de variedades. El promedio general de similitud (de acuerdo con el coeficiente de Dice) alcanzado mediante el análisis fue de 0.43 sin incluir la oportunidad de que las variedades puedan ser combinadas consigo mismas, con valores máximos de 0.74 y mínimos de 0.17. Algunos valores comprendidos entre 0.17 a 0.25 por ser disímiles y aquellos entre 0.74 a 0.70 por su similitud según se vean, pueden ser evaluados en un próximo estudio o en la siguiente campaña de cruzamiento. La construcción de un dendrograma utilizando el método del promedio aritmético de grupos de pares no medidos (UPGMA, Unweighted Pair Group Method using arithmetic average) permitió visualizar las relaciones genéticas de 41 variedades de caña de azúcar. Las relaciones genéticas de los materiales analizados mostraron coeficientes aceptables de acuerdo con la población estudiada (0.34-0.74, 34 y 74% de similitud en los grupos integrados). Como tal, es posible

apreciar en 0.54 la formación de 9 grupos que obedecen principalmente a los centros de desarrollo de los materiales: El grupo I, Ubica principalmente un 75% de accesiones estadounidenses, así como las accesiones incluidas de Barbados, Filipinas y Australia. El grupo II, la accesión de Java. El grupo III, ubicó el 100% de variedades colombianas y de Coimbatore. El grupo IV, ubica principalmente el 100% de las puertorriqueñas. Los grupos contenidos del V al VIII, ubican el 61% de variedades guatemaltecas. Y el grupo IX, algunas accesiones disímiles al grupo procedentes de Guatemala, Cuba y Brasil. Las diferencias analizadas en la población bajo estudio por ende obedecieron exclusivamente diferencias en el ADN muestreado de acuerdo a la especificidad de los "iniciadores o primers" utilizados en las 10 amplificaciones obtenidas en el presente estudio, evitando por tanto, sesgo en el análisis por efectos ambientales.

Recomendando, efectuar cruzamientos entre individuos de los diferentes grupos sin excluir la posibilidad de que, de acuerdo con la experiencia del fitomejorador, se seleccionen algunos individuos dentro de algunos de los grupos para ser cruzados entre sí.

## 1. INTRODUCCION

La caña de azúcar (*Saccharum spp*) se encuentra entre los cultivos más importantes a nivel mundial. Según la International Sugar Organization –ISO, en su publicación realizada en noviembre del 2002 a través de la revista QUARTERLY MARKET REVIEW la producción mundial de azúcar es de 141,752,000 TMVC, el consumo mundial es de 137,390,000 TMVC, la exportación mundial total neta es de 36,566,000 TMVC, del cual América Latina y el Caribe representa el 55% y el resto del mundo el 45%. Aunque cabe resaltar que los diez países líderes responden por el 89% de la misma. Registra en los últimos 14 años una mejora en la producción de caña de 7.73 a 18.37 millones de TC. Y los quintales de azúcar producidos para el mismo período incrementaron de 14.22 a 41.57 millones. En materia de exportación de azúcar Guatemala, ocupa el sexto lugar a nivel mundial, quinto a nivel latinoamericano y primero a nivel Centroamericano, alcanzado para la zafra 2001-2 una producción de 41.57 millones de quintales de azúcar con 179,471 has que rindieron 18.37 millones de TC de caña. Como resultado de ello, la agroindustria azucarera guatemalteca exportó 29.93 millones de quintales y ubicó en el mercado interno 11.64 millones de quintales, con el cual las divisas por exportación de azúcar y melaza permitieron alcanzar US\$262,439,000 (Pappa, 2003)

Para alcanzar la eficiencia antes mencionada en caña de azúcar se ha invertido en mejorar aquellos caracteres de importancia económica. Los diversos centros de mejoramiento sostienen especial cuidado en la selección de progenitores. De lo contrario el proceso es oneroso, pues consume tiempo y dinero.

Actualmente los programas de mejoramiento para caña de azúcar obedecen a caracterizaciones morfológicas y al conocimiento del comportamiento agronómico de los materiales. Por fortuna, avances en biología molecular permiten hoy por hoy, analizar las variaciones directas en el ADN de la población bajo estudio, estas variaciones tienen la ventaja principal de no estar sujetas al ambiente donde se desarrolla el organismo en estudio por un lado y por otro evitar cruzamientos emparentados.

El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA) conjuntamente con la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC), realizó una evaluación de 41 variedades escogidas entre las 152 existentes en su Colección de Trabajo utilizando Marcadores de ADN Polimórficos Amplificados al Azar (RAPD's, Randomly Amplified Polymorphic DNA), con el objeto de medir la similitud genética existente entre ellos, a fin de identificar progenitores para el programa nacional de mejoramiento.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El criterio de selección de progenitores en caña de azúcar es basado en el conocimiento del comportamiento agronómico de las variedades y caracterizaciones fenotípicas. Sin embargo, cuando no se analiza la información contenida en el ADN es posible que el criterio de variabilidad genética analizado se vea afectado por el medio ambiente por un lado y por otro que exista alta similitud genética en los progenitores arriesgando vigor híbrido en la progenie.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

### 3. MARCO CONCEPTUAL

#### 3.1 Taxonomía de la caña de azúcar

La caña de azúcar está ubicada taxonómicamente de la siguiente manera:

|              |                         |
|--------------|-------------------------|
| DIVISIÓN:    | Embryophita siphonogama |
| SUBDIVISIÓN: | Angiospermae            |
| CLASE:       | Monocotyledoneae        |
| ORDEN:       | Glumiflorae             |
| FAMILIA:     | Poaceae                 |
| TRIBU:       | Andropogonae            |
| SUBTRIBU:    | Saccharae               |
| GENERO:      | <b><i>Saccharum</i></b> |

La clasificación de las especies ha sido objeto de estudio de muchos taxónomos y aún quedan aspectos por estudiar y definir. No se tiene como propósito principal analizar detalladamente esta materia.

#### 3.2 Consideraciones generales de *Saccharum*

No se conoce con exactitud el origen de la caña de azúcar; se han propuesto muchas teorías al respecto, sin embargo, se considera que el centro de origen del complejo *Saccharum* es la región que comprende parte de la India, China, Nueva Guinea y zonas aledañas, por encontrarse ahí el mayor número de especies. Posteriormente este género se difundió a otras zonas como Hawaii, Africa Oriental, Madagascar, Medio Oriente, el Mediterráneo y en el Atlántico, en las Islas Canarias. La India es considerada como el primer centro de explotación comercial de la caña, donde se hizo azúcar (Subirós, F; 1975)

El género *Saccharum* corresponde a un complejo constituido por seis especies; cuatro domesticadas (*S. officinarum*, *S. edule*, *S. barberi* y *S. sinensis*) y dos silvestres (*S. spontaneum* y *S. robustum*).

**A. *Saccharum officinarum*** esta especie es originaria de Nueva Guinea, de donde se extendió a Indonesia, Indochina, Burma, India y otros lugares. Es conocida como la caña "noble". Se caracteriza por su alto contenido de sacarosa, tallos gruesos y pesados, con bajo contenido de fibra y altura media. Los entrenudos son cortos en forma de barril, generalmente coloreados (rosado, rojo, amarillo, púrpura, verde, entre otros); las hojas anchas y se desprenden con facilidad. Son exigentes en clima y suelo; también son muy susceptibles a enfermedades. Muchas de las características antes citadas hacen de esta especie un material ideal desde el punto de vista industrial y agronómico. Se presume que esta especie es el

resultado de la domesticación de dos tipos silvestres de *S. robustum* caña empleada por los primitivos para masticar, por su bajo contenido de fibra y por su sabor bastante dulce.

**B. *Saccharum edule*** esta especie es originaria de Nueva Guinea y Melanesia. A veces se ubica en otros grupos y muchas de sus características son similares a *S. robustum*.

**C. *Saccharum barberi*** originaria del norte de la India. Se caracteriza por su altura media, tallos delgados, entrenudos largos y cilíndricos, secciones corchosas en la superficie de los entrenudos, hojas algo angostas y cortas. También porque su contenido de sacarosa es bajo. Posee un sistema radical muy desarrollado y se adapta bastante bien en condiciones adversas de suelo y clima.

**D. *Saccharum sinense*** es originaria de China e India. Se caracteriza por tener tallos altos, de grosor medio en algunas variedades los tallos son delgados; tiene alto contenido de fibra y es pobre en sacarosa; las hojas son angostas y las vainas se adhieren fuertemente al tallo. Algunas variedades, como "Uba", son muy resistentes a la sequía y al virus del mosaico. Pueden permanecer en el campo durante bastante tiempo sin ser cortadas, pues aunque sufren algún deterioro, conservan su capacidad para crecer, sin perjuicio para la cepa. Poseen un sistema radical bien desarrollado. Son resistentes a enfermedades y se adaptan satisfactoriamente a las condiciones desfavorables del clima y del suelo.

**E. *Saccharum spontaneum*** es la especie con mayor distribución ecogeográfica; se extiende desde Afganistán hasta la península Malaya, Taiwán, Nueva Guinea, el Mediterráneo y Africa. Se caracteriza por sus tallos delgados de mediana altura, hojas angostas, entrenudos largos y rectos, alto contenido de fibra y bajo en sacarosa; el sistema radical es bastante desarrollado, se adapta bastante bien cuando existe sequía; es resistente a enfermedades, tolera el frío y es capaz de desarrollarse en condiciones adversas, razón por la que es empleada por los fitomejoradores para incorporar sus características a los nuevos híbridos.

**F. *Saccharum robustum*** se ha encontrado en Nueva Guinea e Indonesia. Es un tipo de caña alta, de gran porte, gruesa y vigorosa, con alto contenido de fibra y bajo en sacarosa. *S. robustum* se ha considerado el ancestro de *S. officinarum*, más que *S. spontaneum*, por desarrollarse en zonas cercanas a esta y por ser susceptible a las mismas enfermedades. Es bastante propensa al virus del mosaico. Los cultivares comerciales son casi exclusivamente cruces derivados de la hibridación de *S. officinarum* y *S. spontaneum*.

Los híbridos poliploides que dieron origen a los cultivares actuales de caña de azúcar se observan en la figura 1. Existen varios géneros relacionados con el género *Saccharum*, tales como *Erianthus*, *Ripidim*, *Miscanthus* y *Narenga* entre otros. Las especies de *Erianthus*, *Miscanthus* y *Narenga*, muestran una menor tendencia a presentar irregularidades meióticas, comparadas con *Saccharum spp* (Subirós R, F; 1975)

**HIBRIDOS INTERESPECIFICOS**

*S. officinarum*

16n = 80

**X**

*S. officinarum*

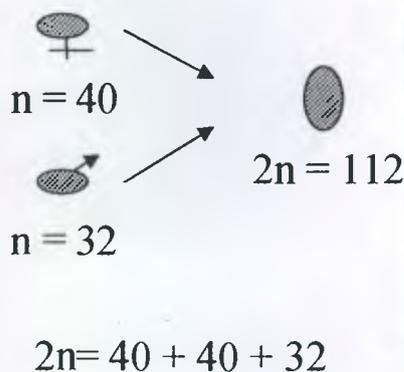
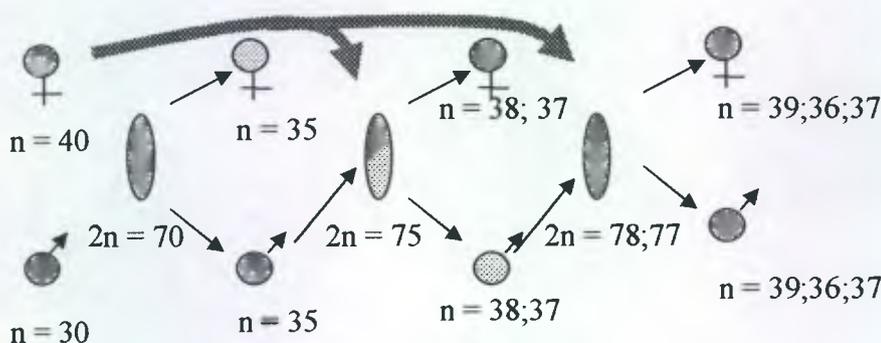
16n = 80

*S. spontaneum*

8n = 40

*S. sinense*

2n = 106-124



*S. robustum*

12n = 60 y  
16n = 80

*S. barberi*

2n = 81-124

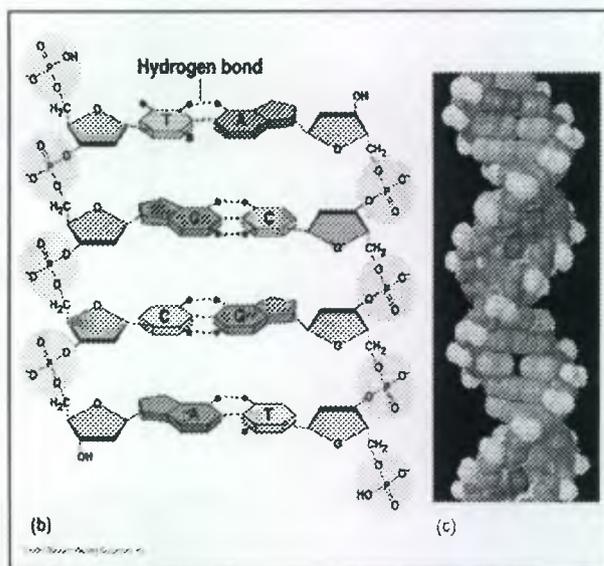


Figura 1. Representación esquemática de la citogenética de los cruces interespecíficos que dieron origen a las variedades actuales de Caña de Azúcar (*Saccharum* spp) (Según concluye Grassl, 1971)

El regreso al tipo altamente productor de azúcar mediante hibridaciones, se obtuvo por retrocruzamientos sucesivos con *S. officinarum* como progenitor femenino recurrente. Este procedimiento se denomina "nobilización". La hibridación interespecífica ha provisto de la principal vía de mejoramiento de caña de azúcar, resolviendo algunos de los problemas de enfermedades, incremento de los rendimientos y la adaptabilidad para el crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés.

El género *Saccharum* representa un rango de ploidia, siendo todas las seis especies poliploides. Estos tienen números cromosómicos entre 100 y 130, de los cuales aproximadamente 10% se piensa que se han originado de *S. spontaneum*. La contribución genética de *S. spontaneum* a los cultivares de caña de azúcar es esencial, pero aún no es bien conocida. El número preciso de cromosomas de *S. spontaneum* presentes en los cultivares modernos de la caña de azúcar es indeterminado, así como su segregación mediante cruzamientos sucesivos. La falta de recombinación entre los cromosomas de las dos especies en los cultivares es una suposición que no ha sido definitivamente demostrada (Glazmann, J.Ch; D'Hont, A. 1999; Grassl, C.O. 1971)

### **3.3 Generalidades del Programa de Mejoramiento en GENGICAÑA**

El programa de variedades de CENGICAÑA tiene como meta contribuir al incremento de la productividad de azúcar mediante la creación de nuevas variedades utilizando un esquema de mejoramiento genético que incluye diferentes etapas de selección de progenies. En dicho esquema, la selección de los progenitores es importante para identificar caracteres de importancia económica. Para ello se han hecho estudios de variabilidad existente mediante una caracterización agronómica y fitosanitaria. Reportándose a la fecha avances significativos, obtenidos a través de la manipulación de la variabilidad existente. Año con año, se inicia (a no ser que los fitomejoradores lo decidan) una campaña nueva de cruzamientos a fin de encontrar combinaciones genéticas favorables. Y considerando que el proceso puede durar entre los 12 años (a través de los cuales se consume tiempo y dinero) los criterios para la selección de progenitores merecen especial cuidado, pensando a la vez que los mismos provienen de cruces intervarietales (y no de líneas puras) provocando por tanto una interesante variabilidad que debe manejarse basándose en la experiencia e información existente (figura 2). De tal forma que ha precisado que se conozcan las variedades a profundidad para que a través del mismo se integre (Orozco, 2003)

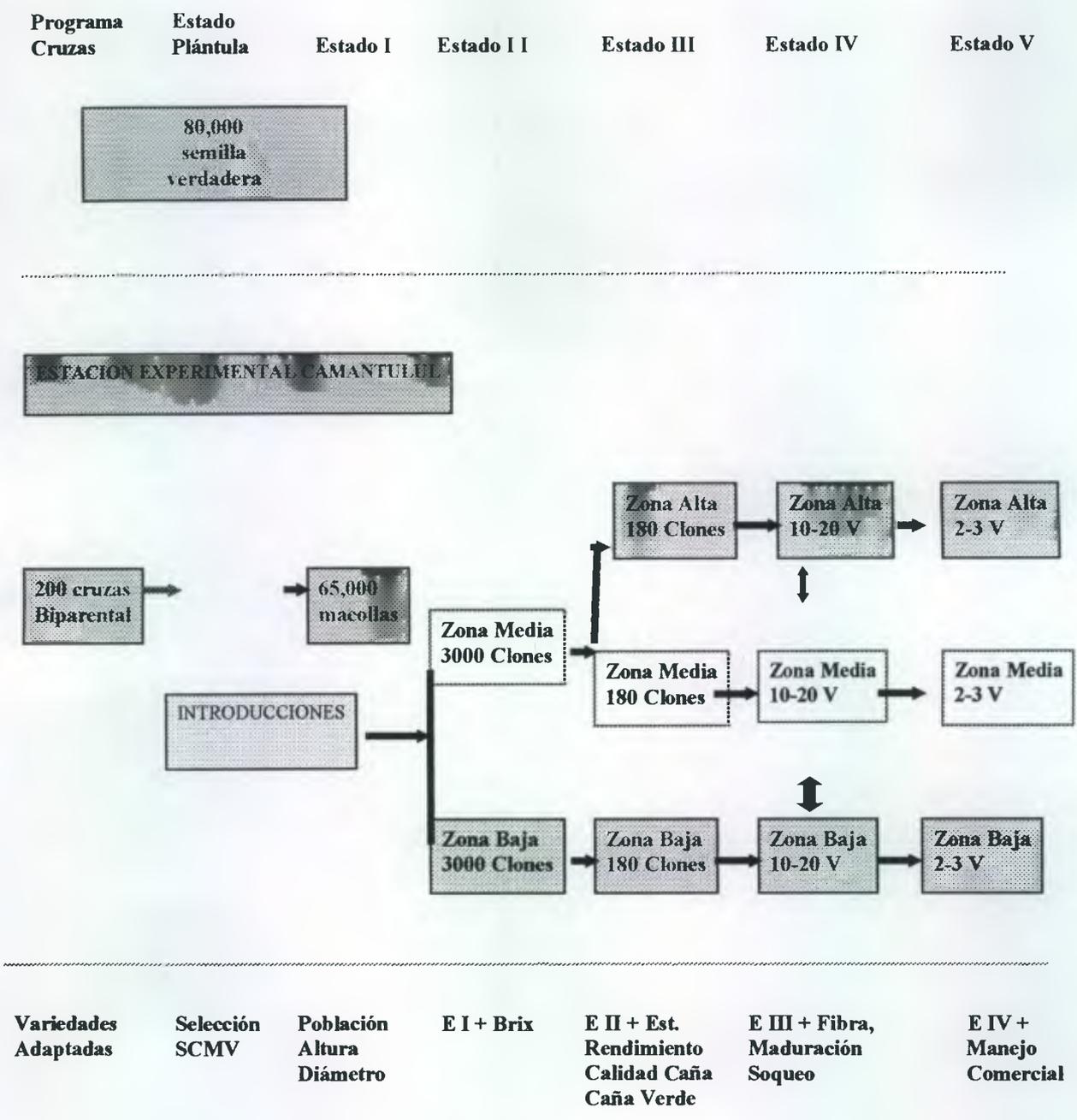


Figura 2. Esquema de Selección del Programa de Variedades de CENGICAÑA. Orozco, 2003.

### 3.4 Marcadores Genéticos

Aunque no se cuente con una especialidad en genética, de alguna manera nos resulta familiar el concepto de herencia genética. Por ejemplo, con facilidad apreciamos similitudes entre los parientes de una misma familia, pero a la vez existe variabilidad, esta variabilidad o "polimorfismo" genético, ocurre en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre dos individuos es útil entonces como una "etiqueta" o "marcador genético" que se convertirá en un rasgo característico y propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos.

El análisis de la variabilidad de una población se realiza con la evaluación de la variación de "marcadores genéticos" los cuales se pueden clasificar en tres categorías: los morfológicos, los bioquímicos y los moleculares. Es necesario escoger cual de los marcadores disponibles es más adecuado en cada caso (León, 2000). Los marcadores morfológicos y los bioquímicos presentan algunas desventajas: los marcadores morfológicos son afectados en algunos casos de manera intensa por el medio ambiente, tanto los marcadores morfológicos y los bioquímicos pueden ser específicos de un tejido en particular o de un estadio de planta. Tal vez la desventaja más importante en este sentido sería el número limitado de marcadores morfológicos y bioquímicos y el enorme esfuerzo requerido para conjugar varias características en una sola variedad y su análisis simultáneo. Estas limitaciones han sido superadas con la nueva generación de marcadores, los llamados marcadores moleculares o los marcadores basados en la variación en el ADN. Los marcadores moleculares no son afectados por el medio ambiente, ya que se basan en las propiedades del ADN y la información genética no cambia aunque las plantas estén sujetas a condiciones extremas y variadas. Además, como se trata de ADN, la información es constante en cualquier parte de la planta y en cualquier etapa de desarrollo. Existe potencialmente un número ilimitado de marcadores moleculares. Los marcadores moleculares detectan la variación natural entre individuos y su herencia sigue las leyes mendelianas. Una ventaja adicional a nuestra disposición es la posibilidad de analizar locis únicos (regiones únicas en el genoma) o locis múltiples (regiones repetidas a través del genoma).

Los marcadores morfológicos son y seguirán siendo esenciales para analizar la variabilidad de las poblaciones. Los marcadores moleculares *de ADN* han abierto nuevos caminos para evaluar la diversidad genética y encontrar la vía para que ésta diversidad pueda ser explotada dentro de la compleja estructura genómica de los cultivares modernos. La detección y el aprovechamiento del polimorfismo en la secuencia del ADN que ocurre en forma natural, representa uno de los acontecimientos recientes más significativos en biología molecular.

El empleo del polimorfismo del ácido desoxirribonucleico (ADN) o marcadores moleculares (MM), de conjunto con los métodos tradicionales de mejoramiento, constituye una vía poderosa para acelerar el

conocimiento genético y aumentar la eficiencia del mejoramiento en la caña de azúcar (Comide, M.T.; Galvez Rodriguez, G. 1999)

Para detectar polimorfismos con marcadores moleculares se han usado dos técnicas básicas de biología molecular: Hibridación tipo Southern y la reacción de polimerización en cadena, (PCR).

La reacción de polimerización en cadena o PCR (Polymerase Chain Reaction), es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos del ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo. Este método fue inventado por Kary Mullis en 1983 e inicialmente fue aplicado por el grupo del departamento de genética humana en Cetus para la amplificación de ADN de la B-globina humana, permite la amplificación específica de regiones de un genoma flanqueadas por secuencias conocidas. Pequeños oligonucleótidos, con homología a las secuencias flanqueantes, son utilizados como iniciadores por la polimerización del ADN de la región de interés (Williams, JG. *et al.* 1990). Y la Hibridación Southern se basa en la propiedad del ADN de hibridar o aparear con secuencias homólogas.

Los marcadores genéticos moleculares tales como: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) y últimamente Microsatélites están siendo rápidamente incorporados en el conjunto de técnicas utilizadas por taxónomos, genetistas y mejoradores (Ramirez, H; Calderon, A; Roca, W.M. 1989)

El producto de dicho proceso permite rastrear "Huellas genómicas o huellas de ADN" estas huellas pueden estar asociadas a un carácter agronómico específico de interés para el investigador, pudiéndose reducir el tiempo para obtener aquel genotipo que tenga un potencial genético deseable, sin necesidad de esperar su madurez y evaluación en ambientes diferentes (Monteczuma, G. 1992)

Los RFLP se basa en la técnica de hibridación tipo Southern, Si cortamos el ADN de un individuo con una enzima de restricción, el patrón preciso de fragmentos puede variar comparado con otro individuo. Esto se debe a pequeños cambios que ocurren en o cerca de los sitios de restricción. Cuando se hibridiza el ADN de diferentes individuos con una sonda específica marcada con un elemento radiactivo, detectamos estos pequeños cambios o polimorfismos como diferencias en la migración de los fragmentos en un gel de agarosa. Fragmentos más grandes corren más lentamente.

Los AFLP, que combina análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción con detección por PCR. La base del polimorfismo de los AFLP es igual que en el caso de los RFLP; En el procedimiento de del AFLP, se corta el ADN genómico con enzimas de restricción como el caso de los RFLP; sin embargo, en lugar de utilizar una sonda para detectar polimorfismos se usa PCR. Los oligonucleótidos utilizados no son de secuencias al azar, sino específicos para los sitios de restricción.

Primero se lleva a cabo una ligación de adaptadores específicos, en los extremos cortados, luego se hace la PCR con oligonucleótidos homólogos a los adaptadores y con una base selectiva.

Durante la reacción en realidad son los fragmentos de restricción los que son amplificados. El marcaje de uno de los oligonucleótidos con radiactividad permite visualizar las bandas amplificadas después de electroforesis en geles de archilamida. Debido al gran número de enzimas de restricción disponibles, y el número posible de permutaciones de secuencias de oligonucleótidos al azar, aunado al hecho que RAPD y AFLP detectan múltiples locis simultáneamente, estos marcadores son potencialmente ilimitados.

Los *microsatélites*, SSR (Microsatellite DNA sequences o Simple-sequence repeats) son muy usadas en descripciones de variaciones genéticas de plantas. Las secuencias de ADN Microsatélites o Simple Secuencias Repetidas (SSR) es un tipo de marcador genético "basado en 1-6 nucleótidos centrales elementos que están en Tandem repetidos desde 2 o muchos miles de veces. Estos marcadores son detectados con amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Browl, et al., 1996).

En 1963 D'Hont y colaboradores realizaron el primer análisis de diversidad genética en caña de azúcar utilizando RFLP. Después de la secuenciación, 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 ésta técnica. En 1,994 Y.H. Lu y colaboradores hicieron un análisis de 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, a detectar marcadores asociados a características de interés y a la construcción de mapas genómicos. 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 (Powell, W. et al. 1996).

A partir de 1990 cuando Williams y colaboradores establecieron 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. 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 1,994 Harvey 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 genera marcadores RAPDs para dos variedades comerciales utilizando 20 iniciadores. Nair demuestra convicentemente 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*.

A partir de estos estudios base para caña de azúcar en 2001 Leon, L.F. utilizó marcadores de ADN RAPDs para la detección de la variación genética en 39 genotipos de caña de azúcar y en el 2004 Queme, J.L. Moline, L. Melgar, M realizaron un análisis de similitud genética entre 48 variedades de caña de azúcar utilizando secuencias de ADN microsatélites. Ambos estudios son utilizados para el programa de mejoramiento de CENGICAÑA.

### 3.4.1 Marcadores de ADN Polimórficos Amplificados al Azar (RAPD's)

La técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA, por sus siglas en ingles), son marcadores moleculares generados por la ampliación de segmentos aleatorios de ADN. La técnica es una variación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para que se lleve a cabo la reacción se requiere del ADN que se desea amplificar; una enzima termoestable conocida como Taq (aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*); magnesio como cofactor de la enzima; secuencias cortas de oligonucleótidos (e.g., 10 pares de bases) conocidas como "primers" y nucleótidos libres. La reacción de amplificación se lleva a cabo mediante cambios de temperatura. El ADN se desnaturaliza por calor (~ 91°C) esta temperatura dependerá de la proporción de pares de bases Guanina-Citosina en la doble hélice (Debido a que cada par de bases G-C tiene tres enlaces de hidrógeno, es más estable que un par de bases Adenina-Timina que tiene solamente dos enlaces). Cuanto más pares de bases estén contenidos en el segmento de ADN, mayor energía es necesaria para separar las dos cadenas. Y al disminuir la temperatura (~42°C) el Oligonucleótido se alinea a uno o varios sitios homólogos en la cadena de ADN desnaturalizada y finalmente se mantiene la temperatura óptima para la enzima (72°C) y de esa forma comienza la fase de replicación.

Esta técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido a lo largo del genoma. Los segmentos de ADN amplificados con ésta técnica son separados por medio de electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (Gallego, G; Gallego, E. 1991. Arreondo, P.R. 1993, Figura 3)

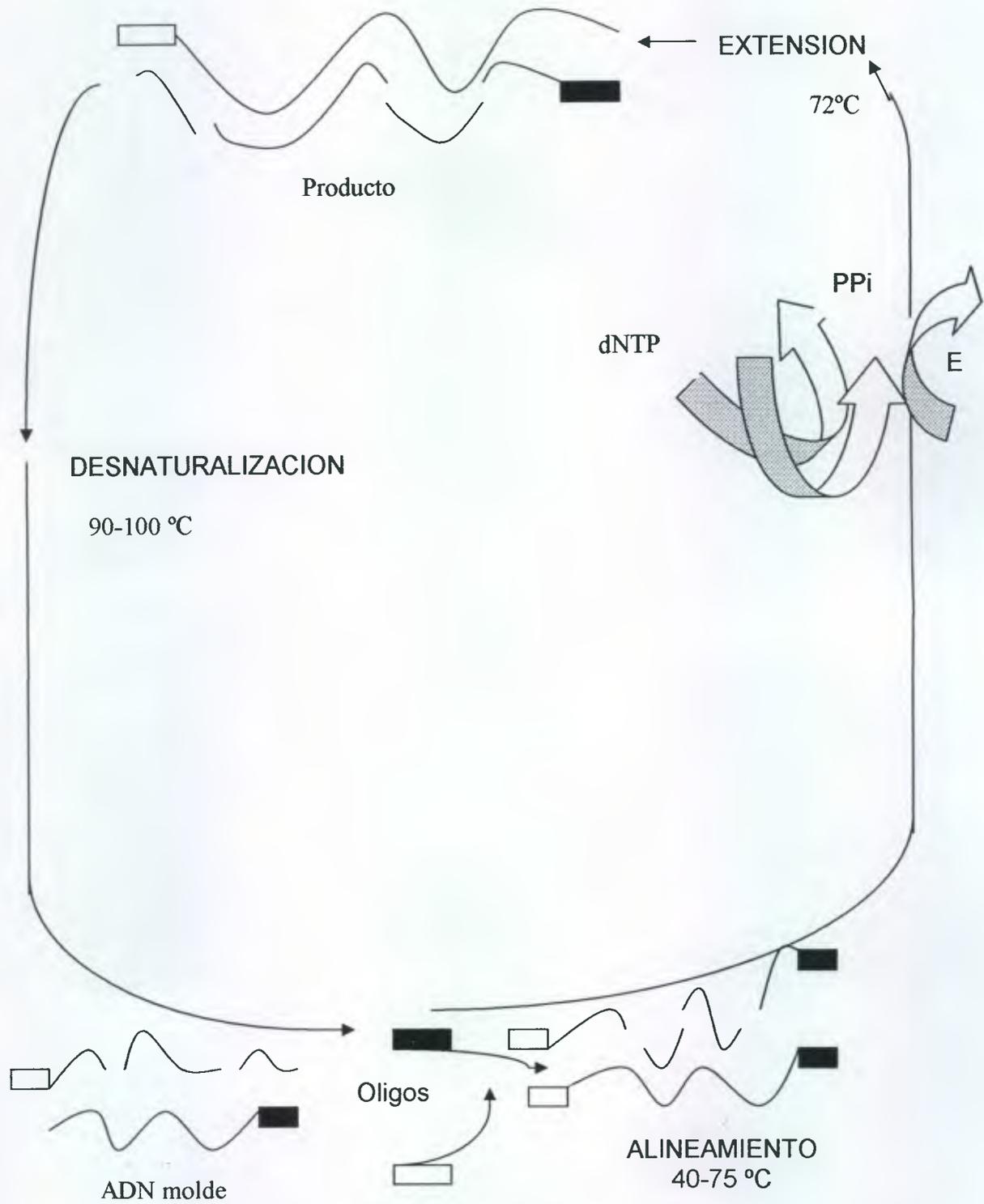


Figura 3. Componentes clave de la mezcla PCR: E, enzima ADN polimerasa; dNTP, desoxirribonucleotido de trifosfato; PPi, Pirofosfato. (Arredondo, P.R. 1993).

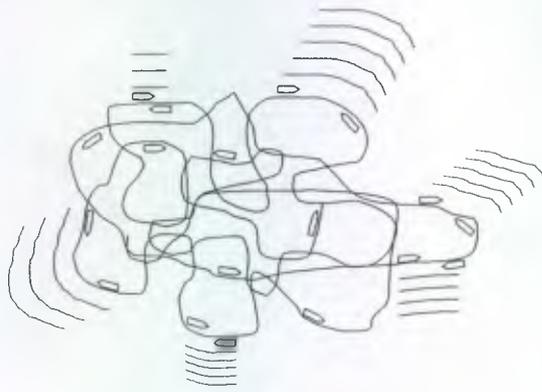
Las bandas son generadas por la existencia de varios sitios de acoplamiento para un oligonucleótido particular. Los polimorfismos (e.g., diferencias en el número de bandas) entre los individuos generados por los RAPD's se deben a cambios en la secuencia de nucleótidos en los sitios de acoplamiento y por inserción o delección de los fragmentos en esos sitios. Y por lo regular no están asociados con caracteres propios de los organismos (Monteczuma, 1993).

Como una regla, los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus. Las mutaciones que inhiben el alineamiento del oligonucleótido o que de alguna forma previenen la amplificación son detectadas por la ausencia (e.g. pérdida de bandas) de fragmentos amplificables de ADN (Williams, *et al.* 1990).

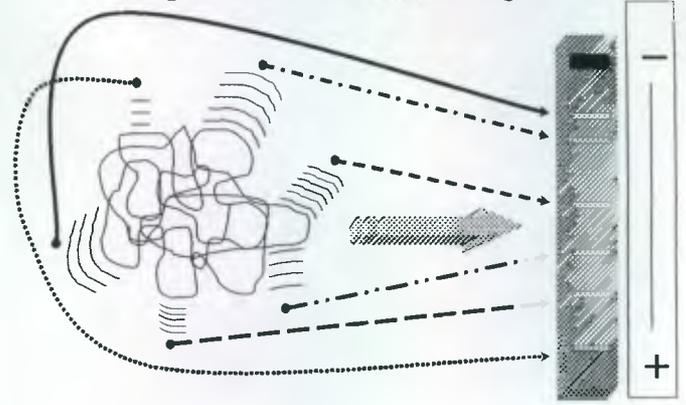
Con ésta técnica no es posible distinguir homócigos dominantes de heterócigos para un fragmento particular.

Los RAPDs se conocen como marcadores dominantes/recesivos ya que el carácter que se obtiene es la presencia/ausencia de una secuencia amplificable. Por lo tanto, los términos dominante y recesivos aplicados a los datos de RAPDs solo se refieren a la amplificación o no durante la reacción en cadena de la polimerasa. (Otero Amaiz, A; De La Cruz, M; Oyama, K. 1997; figura 4).

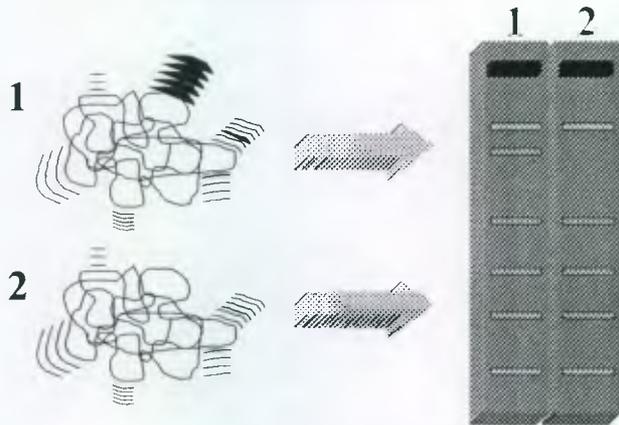
Amplificación de ADN anónimo con cebadores de secuencia arbitraria



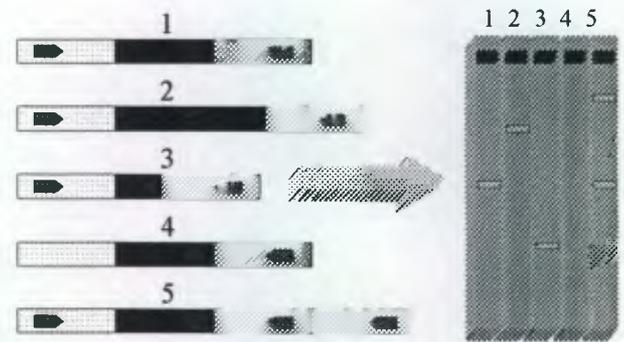
Correspondencia entre fragmentos amplificados y bandas en un gel



Obtención de RAPDs



Origen del polimorfismo de los RAPDs



Los RAPDs son marcadores dominantes

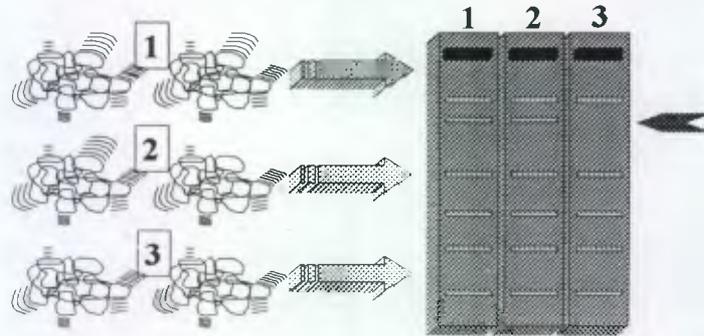


Figura 4. Análisis Esquemático de la Técnica RAPD's (Silio, L; Gallego,F. 2001)

### 3.4.1.1 Los Componentes del PCR-RAPD`s

La eficacia del PCR está medida por su especificidad, eficiencia y fidelidad. En principio cada componente físico y químico del PCR puede ser modificado para producir un incremento en el producto. Debido al complejo de interacciones entre los componentes de la PCR y la amplia variedad de aplicaciones en las que ésta técnica se ha usado, no hay un listado único de condiciones que puedan ser las óptimas para todas las posibles reacciones; sin embargo aquí se citan los componentes más comúnmente utilizados.

#### a) El ADN molde

Las preparaciones del ADN molde se pueden obtener de extractos semicrudos y no es necesario purificar exhaustivamente éste ADN. Cuando se trabaja con ADN genómico, cuyo tamaño molecular y complejidad son elevados, normalmente se aplican entre 0.5-1.0  $\mu\text{g}$  de ADN a la solución de amplificación, pero en ocasiones el fragmento de interés ya está clonado en algún vector, por ejemplo en un plásmido, y en ese caso disminuye la cantidad de ADN a amplificar, en donde se pueden utilizar tan solo unos cuantos nanogramos (Background, 1992).

Uno de los problemas en la extracción de ADN de plantas es la **composición de la pared celular** la cual dificulta el acceso al interior para extraer su contenido, por ello dicha pared celular debe romperse para liberar los constituyentes celulares, lo cual se hace generalmente por acción mecánica, pulverizando el tejido con hielo seco o con nitrógeno líquido.

Posteriormente las membranas celulares deben destruirse de manera que el ADN sea liberado dentro del buffer (tampón) de extracción en presencia de detergentes y soluciones de baja o alta fuerza iónica (el ADN es menos soluble en soluciones de fuerza iónica intermedia [0.4-0.8 M]). Es importante asegurarse que una cantidad significativa de ADN no sea atrapada en los desechos o restos celulares, y/o que el ADN esté completamente dissociado de proteínas y otros contaminantes que podrían interferir con el subsecuente análisis.

El ADN debe ser protegido de la acción de enzimas (nucleasas), para éste propósito se usan detergentes como el EDTA (ácido etilene-diamintetraacético), agente quelante que une iones de magnesio, el cual es considerado un cofactor necesario para la mayoría de las nucleasas. Después de la incubación inicial, las proteínas denaturadas y la mayoría de los carbohidratos son removidos al emulsificar la mezcla buffer (tampón)/tejido con fenol (desnatura y separa las proteínas de el ADN) o cloroformo. Puede darse una etapa adicional de cloroformo para agudizar la fase de separación entre los solventes orgánicos y la fase acuosa.

Finalmente, hay que separar el ADN de la fase acuosa, para lo cual se debe precipitar el mismo, usando un alcohol como el etanol puro o el isopropanol, siendo el último más selectivo en la precipitación del ADN en presencia del ARN; sin embargo, el isopropanol requiere alta concentración de ADN para dar

mejor rendimiento después de precipitado el ADN se disuelve en una solución tampón (TE pH: 8.0) o en agua bidestilada; el ARN, es removido adicionando enzima RNAasa a la solución.

Otra consideración importante en el aislamiento del ADN, es la contaminación de la muestra con polisacáridos (no removidos durante el proceso de extracción) que afectan la pureza del ADN; éstos *carbohidratos* pueden inhibir la actividad de algunas enzimas como: como polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción, pudiendo interferir con la concentración del ADN y además el ADN puede ser parcialmente digerido. Para prevenir tal contaminación debe tenerse en cuenta que la base para la separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos, es su diferencial solubilidad en presencia de detergentes como el CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio) o combinar el CTAB con un paso posterior de fenol-cloroformo puede resultar efectivo para eliminar complejos de carbohidratos.

En algunos tejidos el ADN extraído puede presentar una coloración gris o parda, la cual se debe probablemente a la actividad de polifenoloxidasas, para evitar tal situación se recomienda incluir en el buffer de extracción P.V.P. (Polivinil pirrolidona).

**Tabla 1. Reactivos empleados en la extracción de ADN (diversas fuentes)**

| REACTIVO                                       | CARACTERISTICA       | FUNCION  |
|--|----------------------|--|
| 1. TRIS (hidroximetil amino metano)            | Tampón Biológico     | - Mantener estable el pH de la solución (pH: 7.0-8.0)  |
| 2. EDTA (Etilen diamino tetra acético)         | Agente Quelante      | - Toma iones Mg <sup>++</sup>  |
| 3. Acetato de Sodio                            | Sal                  | - Precipita el ADN   |
| 4. Acetato de Potasio                          | Sal                  | - Precipita proteínas  |
| 5. Fenol                                       | Solvente Orgánico    | - Desnaturaliza Proteínas  |
| 6. Cloroformo                                  | Solvente Orgánico    | - Remueve lípidos<br>- Desnaturaliza proteínas<br>- Solubiliza al fenol y lo elimina de la solución. |
| 7. SDS (Sodio dodecil sulfato)                 | Detergente Aniónico  | - Solubiliza proteínas, tejidos y membranas.   |
| 8. Sarkosil (Laurel sarcosina)                 | Detergente Aniónico  | - Inhibe hexoquinasas<br>- Semejante a la actividad del SDS.   |
| 9. CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio) | Detergente Catiómocp | - Solubiliza polisacáridos   |
| 10. β-Mercaptoetanol                           | Antioxidante         | - Evita color pardo<br>- Escinde puentes disulfuro   |
| 11. Triton X-100                               | Detergente polar     | - Disuelve componentes de tejidos y membranas  |
| 12. DTT (Ditriotreitol)                        | Antioxidante         | - Reduce grupos sulfuros de proteínas.<br>- Baja concentración permite actividad enzimática.         |

Continua..... pagina siguiente.

Continuación.... Tabla 1.

|                                 |            |   |
|---------------------------------|------------|---|
| 13. Octanol-alcohol isoamílico  | Alcohol    | - Agentes antioxidantes<br>- Disminuye formación de interfases.         |
| 14. PVP (Polivinil pirrolidona) | Detergente | - Elimina compuestos fenólicos que pueden inhibir actividad enzimática. |
| 15. Etanol-Isopropanol          | Alcoholes  | - Precipitan Ac. Nucleicos (A bajas temperaturas).                      |
| 16. RNAsa                       | Enzima     | - Elimina ARN   |
| 17. NaCl, KCl                   | Sales      | - Equilibrar las fuerzas iónicas.                                       |

Existen por tanto varios protocolos y kits para la extracción de los mismos auxiliándose de la acción de CTAB, SDS y acetato de potasio, Extracción con la técnica alcalina y extracción con proteinasa K.

### b) El amortiguador

La solución amortiguadora estándar para el PCR contiene KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.4, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM y gelatina en concentración de 100µg/ml. De entre esos componentes la concentración del ion Mg es de mucha importancia, ya que depende de ella la eficiencia y la especificidad de la ampliación, en cuanto al alineamiento de los oligonucleótidos con el ADN molde y la actividad de la polimerasa; Generalmente se obtienen buenos resultados cuando ésta concentración varía en intervalo de los 1.5 a los 4 mM, sin embargo, es importante mantener baja la concentración de EDTA, ácido etilendiaminotetracético, que es un quelante de iones mono y divalentes, y el cual es un componente común en los amortiguadores en los que se disuelve el ADN, el que puede modificar la concentración final del Mg<sup>++</sup> libre en el amortiguador de amplificación.

Sin embargo, la concentración óptima del MgCl<sub>2</sub> puede variar entre 0.5 mM a 5mM. Aunque el buffer estándar puede trabajar bien para un amplio rango de plantilly primers, el buffer optimo varía para un particular PCR dependiendo del ADN, secuencia del primer, concentración de otros componentes en la relación. La concentración de Mg debe modificarse cuando una nueva combinación de ADN-primer se usa o cuando la concentración de los dNTPs o Primers es alterada. Los dNTP's son la principal fuente de grupos fosfatos en la reacción y los cambios en la relación afecta la concentración disponible de magnesio. La presencia de cationes divalentes es crítica. Algunos investigadores usan Triton X-100, gelatina o BSA para estandarizar las enzimas y glicerol o formamida para aumentar la especificidad.

### c) Los desoxirribonucleótidos de trifosfato, dNTPs

Al llevar a cabo la reacción de síntesis de una cadena complementaria, la ADN polimerasa incorpora desoxirribonucleótidos al formar un enlace fosfodiéster entre el grupo -OH libre en el extremo 3' de la cadena naciente y el grupo fosfato 5' del dNTP; La energía para tal reacción proviene de la hidrólisis del fosfato  $\gamma$  de cada dNTP que se incorpora. En el caso del PCR, cada dNTP se agrega a la solución en una concentración que oscila alrededor de las 200  $\mu\text{M}$ , sin embargo, es muy importante mantener la concentración equimolar entre los cuatro dNTPs, lo que evita que la Taq ADN polimerasa incorpore un dNTP equivocado en determinadas posiciones, lo que incrementaría la tasa de error de la polimerasa por nucleótido que se polimeriza, la cual se calcula como  $1.5 \times 10^{-5}$  y  $0.7 \times 10^{-5}$  para sustituciones o cambios del marco de lectura, respectivamente. Por otro lado, se sabe que cuando la concentración de los dNTPs excede los 50mM, se inhibe la actividad de la Taq ADN polimerasa.

Una mezcla desbalanceada de dNTP's (Concentración de los 4 dNTP's desigual) puede reducir la fidelidad de la Taq. Los stocks de dNTP's deben estar a un pH 7.0. La concentración de deoxinucleotidos entre 20-200 $\mu\text{M}$  de cada uno resulta un balance óptimo entre producto, especificidad y fidelidad. La especificidad del PCR se aumenta utilizando concentraciones de dNTP's mas baja que el recomendado para PCR mediado por Klenow (1.5mM cada uno). Se debe decidir entre la más baja concentración de dNTP apropiada para la longitud y composición del ADN a amplificar.

Por otro lado también se discute respecto a los dNTPs concentraciones entre 50-200 $\mu\text{M}$  cada uno, asegurando que si las concentraciones son altas es posible que se promuevan falsas incorporaciones por la polimerasa, lo que debe evitarse (Valdez Moctezuma, 1995).

### d) Los Oligonucleótidos sintéticos

Para que la reacción se lleve a cabo es necesario seleccionar dos oligonucleótidos sintéticos, u oligos, que hibriden con regiones del ADN molde que se localicen en los extremos de la región de interés. Estos óligos se deben orientar con sus extremos 3' (OH) hacia el oligo opuesto, es decir, deben estar encontrados, y ser complementarios para ambas cadenas del ADN molde. La longitud de los oligos es de 10 a 30 nucleótidos, y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la secuencia blanco, ya que de ello depende el éxito y la especificidad de la amplificación; se recomienda que la complementariedad entre el oligo y la secuencia blanco sea cercana al 100%, en las últimas 5 a 6 bases del extremo 3' de oligo, para asegurar la amplificación. Además se debe evitar que ambos oligos muestren secuencias complementarias entre sí, particularmente en sus extremos 3', para evitar la formación de dímeros o concaténmeros; así mismo también es necesario evitar la presencia en los oligos de secuencias que favorezcan la formación de estructuras secundarias que pueden interferir en el

alineamiento correcto. Típicamente el contenido de G + C debe ser alrededor de 40 a 60% para ambos oligos.

Generalmente se considera determinar el valor de  $T_m$ , o temperatura de fusión de los oligos, ya que éste valor resulta necesario para calcular la temperatura teórica en la que se debe llevar a cabo el alineamiento, o  $T_a$ ,

$$T_a = T_m - 50C = 2(A+T) + 4(G+C) - 50C$$

Este valor de  $T_a$  normalmente oscila entre los 60 a 65°C, sin embargo, dadas las características del sistema de amplificación, en donde a mayor temperatura, es decir, en condiciones astringentes, la especificidad será mayor y a la inversa. Usualmente, 20 segundos de extensión es suficiente para amplificar fragmentos más pequeños que 500bp y 40 segundos para fragmentos mayores a 1.2 kb. Sin embargo esto puede variar ya que la Taq ADN polimerasa puede adicionar 60 bases por segundo a 72°C.

Generalmente los oligos se añaden a la solución de amplificación en una concentración que oscila entre los 0.1 y 1.0  $\mu\text{M}$ . Pero la concentración óptima, así como la concentración del ADN se determinan empíricamente. Si hay poca plantilla o primers imposibilita la unión a su secuencia complementaria. Mucha plantilla puede ayudar a eventos de mal apareamiento. Otra situación que puede presentarse debido a altas concentraciones es generar artefactos independientes de plantilla denominado "Primer-Dimer". Productos no específicos y Primer-Dimer son sustratos para PCR y compiten por el producto deseado por enzima, dNTP's y primer resultando en una disminución de la concentración de producto deseado (Valdez Monteczuma, 1995).

#### e) La enzima ADN polimerasa

La purificación es a partir de una bacteria termofílica llamada *Thermus aquaticus* y por ello a esta enzima actualmente se le conoce como Taq ADN polimerasa. Esta enzima tiene un peso molecular cercano a los 93.910 kDa con una actividad específica de 200,000 U/mg, cuya temperatura óptima, en donde se observa su actividad máxima es entre los 75-80 °C; su tasa de incorporación de nucleótidos,  $K_{cat}$ , es de unos 150 nucleótidos/s/enzima. La vida media de la actividad de la Taq es más de 2 horas a 92.5°C, 40 minutos a 95°C y 5 minutos a 97.5°C.

La función de la enzima es llevar a cabo la síntesis de la cadena complementaria del ADN molde en el sentido 5' a 3' siempre y cuando exista un grupo -OH libre en la posición 3' de un fragmento de ADN que se conoce como cebador o primer. A partir de donde se inicia la síntesis.

Una concentración recomendada de Taq está entre 1 y 2.5 unidades por 100 $\mu\text{l}$  de reacción cuando otros parámetros son óptimos. Para optimizar un PCR es recomendable probar concentraciones de enzima que vallan desde un rango de 0.5-5.0 unidades por cada 100 $\mu\text{l}$  de reacción. Si la concentración

de la enzima es alta se pueden producir amplificadores específicos y si es baja, poca cantidad de producto es sintetizado.

#### f) El Agua

Definitivamente otro de los parámetros a considerar es la calidad del agua que se utiliza en el "Master Mix" tanto por el aspecto de contaminación como por aspectos de sales u otros productos que pudiera contener, por tanto se recomienda usar agua tridestilada-autoclaveada, importante a la vez alicuotarla para evitar su contaminación mediante el uso constante.

#### g) El ciclo térmico

La elección de la temperatura de apareamiento es probablemente el factor más crítico en la búsqueda de un PCR específico, si la temperatura es muy alta no hay apareamiento, pero si es baja se producen apareamientos no específicos. La temperatura y la longitud del tiempo para el apareamiento esta en función de la composición de bases, longitud y concentración de los primers. Una temperatura aplicable es 5°C por debajo de la verdadera temperatura de amplificación. Temperaturas entre 55°C y 72°C generalmente produce mejores resultados. Para una mayor especificidad en los ciclos iniciales, la Taq "puede" adicionarse después del primer ciclo de denaturación durante el apareamiento. Un error común es hacer muchos ciclos en un PCR: Un número muy alto de ciclos puede incrementar la cantidad y complejidad de productos no específicos y pocos ciclos disminuyen el producto.

#### 3.4.1.2 Detección de diferencias entre individuos

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 polimorfismo. Estas 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.

La electroforésis es una técnica muy utilizada para la separación de los ácidos nucleicos y, en general, la movilidad del ADN a través de la matriz está en función de su carga negativa, por lo que los fragmentos tenderán a emigrar hacia el polo positivo de la cámara de electroforésis. La técnica envuelve la separación de dichas moléculas con base en su movimiento bajo la influencia de un campo eléctrico. Fue desarrollada inicialmente por Ame Tiselius en 1930 para la separación de proteínas séricas.

El tipo de electroforésis que utiliza para la separación de los ácidos nucleicos es la electroforesis zonal. En ella se utilizan medios de soporte para crear zonas separadas en las que casi todas las moléculas de una mezcla pueden identificarse independientemente. Los medios de soporte más utilizados

son los geles (agarosa y poliacrilamida). Estos se ponen en contacto o sumergen en una solución buffer que permite la conducción del campo eléctrico a lo largo de todo el sistema.

#### **3.4.1.2.1 Factores que afectan la tasa de migración electroforética**

##### **A) Dependientes de las moléculas a separar:**

a. **Tamaño molecular**, En general se tienen que moléculas con mayor tamaño molecular migran mas lento a lo largo del gel que moléculas con un tamaño molecular bajo. Esto es deducible debido a que físicamente es más difícil para las moléculas grandes deslizarse a lo largo de los poros de un gel. Así, la tasa de migración es inversamente proporcional al logaritmo del número de pares de bases en los ácidos nucleicos.

b. **Conformación**, las moléculas superenrolladas o superhelicoidales son más compactas que las moléculas lineales: por esta razón, tienen una tasa de migración mayor.

##### **B) Dependientes del sistema electroforético:**

a. **Concentración del gel**. A una mayor concentración del gel, los poros a través de los cuales se desplazan las moléculas son de un menor tamaño y, por tanto, dichas moléculas migrarán a una tasa menor.

b. **pH del buffer**. Cuando el pH de la solución buffer en la que se está llevando a cabo la electroforesis es mayor, los polinucleótidos migran más rápidamente debido a que su carga se hace mayor.

c. **Composición del buffer**. Los cationes que pueden estar componiendo el buffer se unen a las cargas negativas de los polinucleótidos neutralizando algunas de sus cargas negativas y retrasando así la migración electroforética. Cuando los buffers tienen una alta fuerza ionica se pueden dar distorsiones en la corrida electroforética debido al aumento considerable de la temperatura. Los buffers más utilizados en la electroforésis de ácidos nucleicos son TAE (Tris-Acetato-EDTA), TBE (Tris-Borato-EDTA) y TPE (Tris-Fosfato-EDTA).

d. **Voltaje aplicado**. La movilidad electroforética es directamente proporcional al voltaje aplicado.

e. **Temperatura**. En general la temperatura no afecta la tasa de migración electroforética en geles de agarosa. En geles de poliacrilamida un aumento de temperatura puede significar una mayor tasa de migración. Por otro lado, la temperatura puede ser un factor de distorsión de la corrida electroforética porque diferencias en temperatura causan cambios en la densidad y viscosidad del gel. Temperaturas extremadamente altas causan evaporación del buffer de electroforésis y subsecuente concentración de las sales presentes en él.

### 3.4.1.3 Tinción de Geles

La visualización de las moléculas de ADN, ARN y proteínas separadas mediante electroforesis, se lleva a cabo mediante el uso de ciertos compuestos químicos en solución que tienen la capacidad de reconocer a estas macromoléculas en el gel e interaccionar con ellas. Dependiendo del tipo de compuesto químico que se utilice, su visualización puede ser directa o con luz UV. Varios métodos se han desarrollado para tales efectos, pero aquí solo se describe el que se utilizan de manera frecuente en la tinción de ácidos nucleicos. Principalmente en la técnica RAPD's. El ADN puede visualizarse en el gel por previa tinción con una solución de "bromuro de etidio" (0.4-1.0 µg/mL) durante 15 minutos y posterior observación con luz UV. El bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino-6-etil-5-fenilfenantridio) (Etidium bromide, EBr, EtBr; 3,8-diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridium bromide): es un colorante cancerígeno fluorescente que se intercala entre los pares de bases de doble cadena del ADN y del ARN. El complejo ácido nucleico-bromuro de etidio fluorescente cuando se expone a luz UV de longitudes de onda de 300 nm o menores. Se utiliza para visualizar moléculas de ácido nucleico de doble cadena en geles de agarosa o poliacrilamida por emisión de fluorescencia a 590 nm. En condiciones de tinción apropiadas, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la masa de los fragmentos de ADN o ARN que permiten su determinación. El BrEt también se usa para la separación de ADN circular covalente cerrado (ADNccc), a partir de duplos lineales por centrifugación con gradientes de densidad. La capacidad del bromuro para pegarse a las moléculas lineales es elevada además que tiene alta densidad con respecto a los cccADNs que están superenrollados y no pueden integrarse como muchas moléculas seguidas.

La cantidad de ADN que puede visualizarse dependerá del grosor del gel y del tamaño del pozo. En un minigel (de 10 a 11 mL de agarosa en una placa de vidrio de 7.5 x 5 cm) y un pozo de 0.3 cm, la cantidad mínima de ADN que se puede visualizar es de aproximadamente 1 ng. También es posible la detección de los ácidos nucleicos cuando el bromuro de etidio se incorpora a la muestra antes de la electroforesis.

El transiluminador es una fuente de luz UV que sirve para inducir la emisión de luz fluorescente a partir del colorante intercalado entre las dos cadenas del ADN duplo (bromuro de etidio), o las dobles cadenas de ARN, permite visualizar moléculas de ácido nucleico separadas en el gel mediante electroforesis. En un transiluminador, la lámpara de luz UV está colocada en un soporte apropiado debajo del gel y la radiación UV está dirigida hacia el investigador (por esta razón es necesaria la protección de los ojos con caretas o anteojos apropiados).

#### 3.4.1.4 Análisis e Interpretación de Huellas de ADN

Un patrón de huellas genéticas obtenido de una muestra de ADN particular, es raramente informativo por si mismo. En lugar de eso, los patrones originados de diferentes muestras deben ser comparados unos con otros. Para hacer esto, a las bandas individuales dentro de una línea en el gel se les asigna una posición particular (esto es frecuentemente hecho por fragmentos indicadores del peso molecular) y diferentes líneas son simultáneamente analizadas por comigración de bandas del mismo tamaño (bandas iguales); sin embargo, esta técnica tiene algunos problemas y consideraciones generales asociadas con el tamaño del fragmento y el análisis simultáneo. En definitiva, lo que se pretende es codificar la presencia de bandas colocando "uno, 1" y de la misma manera la ausencia de bandas con "cero, 0" para un peso molecular en particular. Debido a que las bandas o huellas provienen de la amplificación de fragmentos de ADN en las regiones de homología para una región en particular es posible comparar los materiales y de esa forma conocer cuan similares genéticamente son los individuos (en este caso particular, variedades). Una vez generadas las matrices deberá calcularse la similitud de los materiales y construir un dendrograma para visualizar las relaciones.

#### 3.5 Análisis estadístico en NTSYSpc

NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Análisis System) está diseñado para realizar una confortable variedad de análisis, (Rohlf, f.j. 2003). Pero para análisis como los realizados en el presente basta con construir cuidadosamente la matriz de presencia-ausencia proveniente de la amplificación de fragmentos generados por los iniciadores y preferiblemente "unir" las matrices generadas por los iniciadores de tal forma que obvie el peso molecular de los fragmentos amplificados y que permita rastrear la mayor cantidad de ADN posible. Dentro de las características para poder iniciar el corrimiento, el programa examina la información que está por ingresar mediante el STAND module. De tal manera que los datos son previamente estandarizados impidiendo errores tanto en filas como en columnas de tal forma que chequea el polimorfismo ingresado y nos brinda sus comentarios.

Seguidamente una matriz de similaridad o de disimilaridad tiene que ser producida. Esta brinda una medida de dis/similaridad entre todos los pares de OTUs (columnas) de la matriz estandarizada de datos. El SIMQUAL module es usado para variedades cualitativas (e.g., presencia/ausenta). Este incluye estos coeficientes, el seleccionado para el presente análisis fue el coeficiente de Dice de tal forma que genera una matriz que permite visualizar la similitud genética de los materiales en estudio (todos contra todos).

SAHN lleva a cabo la aglomeración necesaria para el análisis clustrer, este incluye los métodos tales como UPGMA (Unweighted pair-group method, arithmetic averange) que es a menudo el más usado y es llamado "el vecino más cercano". Esta estrategia computa la distancia promedio desde un cluster (IJ).

Este procesa la distancia de todos los pares de individuos en el cluster ( $n_i, n_j$ ). La distancia entre el grupo (IJ) y otro cluster H es obtenida por

$$D(ij)H = \frac{\sum_i \sum_k D_{ik}}{(N_{(k)} N_{(H)})}$$

Donde  $D_{ik}$  es la distancia entre individuos en el cluster (IJ) e individuo k en el cluster H.  $N_{(k)}$  y  $N_{(H)}$  son los números de ítems en el cluster (IJ) y H, respectivamente. Los parámetros usados por la fórmula combinatoria son  $\alpha_i = n_i / n_k$ ,  $\alpha_j = n_j / n_k$ , y  $\beta = \gamma = 0$  (Everitt, 1980; Lance and Williams, 1967 citados por F, Rincón et al).

Por último la opción TREE despliega el árbol (e.g. formando un análisis cluster) como el gráfico de fenograma. Este provee algunas opciones en cuanto a la escala y manuscritos acerca de lo interactivo del árbol.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Determinar la dis/similitud genética entre variedades, con el propósito de identificar progenitores contrastantes a fin de buscar heterosis en las hibridaciones.

### **4.2 Específicos**

- 4.2.1 Registrar el patrón electroforético producto de la amplificación de las variedades bajo estudio para analizar la condición generada por el iniciador.
- 4.2.2 Calcular el coeficiente Dice a fin de conocer la similitud genética de las variedades bajo estudio.
- 4.2.3 Construir un dendrograma para analizar las relaciones genéticas de las variedades bajo estudio.

## **5. HIPOTESIS**

Existe variabilidad genotípica entre las variedades analizadas por lo que los "iniciadores o primers" mostrarán alto Polimorfismo y por lo tanto un índice de similitud bajo.

## **6. VARIABLES RESPUESTA**

- 6.1 Presencia-ausencia de regiones amplificadas por los iniciadores en estudio.
- 6.2 Número de fragmentos producidos en el patrón electroforético a partir del iniciador.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1 Fuente y Características del Material Vegetal

El material utilizado para el presente estudio fue seleccionado por CENGICAÑA, éste básicamente está conformado por una porción de la Colección de Trabajo, la cual a la vez forma parte de la Colección Nacional de Caña de Azúcar de dicho centro. De tal forma que, los materiales han sido creados en diferentes programas de cruzamiento existentes para cada país. Por ende, los progenitores utilizados para la conformación de cada material difiere. En tal sentido se espera encontrar variabilidad genética en los materiales. Se visitó la colección de trabajo de CENGICAÑA y se colectaron 3 porciones meristemáticas para cada variedad analizada, se trasladaron debidamente identificadas con hielo seco al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC (FAUSAC) para colocar el material a una temperatura de -20 °C para iniciar el proceso de extracción de ADN únicamente con meristemas apicales. 41 variedades fueron analizadas en el presente estudio (Tabla 2).

**Tabla 2. Variedades de caña de azúcar a caracterizar por RAPD`s. Segunda etapa CENGICAÑA, Abril 2001**

| Variedades que se cultivaron con éxito en Guatemala.   | Variedades que se cultivan actualmente en Guatemala.  | Variedades exitosas como progenitores en otros países.   | Variedades promisorias del programa CENGICAÑA.   |
|--|---|--|--|
| B37172<br>CP57603<br>CP65357<br>C8751<br>L6840<br>P3311<br>POJ2878<br>Q96  | CP722086<br>CP721210<br>CP881508<br>Mex69290<br>POJ2878<br>JA6419<br>JA6420<br>MZC74275<br>Mex79431<br>PR783025<br>PR872048<br>PR752002 | CP63588<br>CP701133<br>CC8475<br>CC8573<br>Co421<br>CG9637<br>CG9678<br>CG9628<br>CG96143<br>CG9652<br>CG9783<br>CG97100<br>CG9796<br>CG9797<br>CGCP9555<br>MY7464<br>SP792233 | CP881165<br>CB4647<br>CG9640<br>CG9601<br>CG9659 |
| Guatemala (CG, CGCP), Barbados (B), Cuba (C, My, Ja), Colombia (CC y MZC), Coimbatore (Co), Estados Unidos (CP, L), México (Mex), Java (POJ), Puerto Rico (PR), Brasil (SP, CB), Australia (Q), Filipinas (P). |   |  |  |

## 7.2 Preparación de Cristalería y Equipo

Es importante tener prevista toda la cristalería a utilizar entre las que mencionamos: tubos eppendorf para microcentrífuga, pinzas, morteros, pistilos, bisturís, papel mayordomo, papel aluminio. Para los cuales deben estar debidamente desinfectados y esterilizados en su defecto. El equipo debe chequearse que para su desempeño se encuentre trabajando con cada una de sus especificaciones para evitar dañarlo.

## 7.3 Extracción de ADN utilizando genelute, SIGMA

### A) Los requerimientos para iniciar el proceso de extracción de ADN

- a. Dejar un día antes los morteros y pistilos en enfriamiento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) o enfriarlos poco a poco con pequeñas cantidades de nitrógeno líquido. (el nitrógeno líquido tiende a evaporarse por lo que hay que conseguir un recipiente hermético adecuado para este fin, de lo contrario se perderá en un tiempo de unas cuantas horas).
- b. Se prepara el baño maría a  $65^{\circ}\text{C}$ .
- c. Se precalienta el buffer TE a  $65^{\circ}\text{C}$ .
- d. Se precalienta la solución de ligamiento (binding solution) teniendo cuidado de cerrar bien la tapa para evitar que se evapore, ya que contiene alcohol al 95%.

### B) Proceso de extracción de ADN (Todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente)

- a. Se macera el tejido en un mortero utilizando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se transfiere aproximadamente 100 mg de polvo fino a un microtubo. Almacenar el microtubo conteniendo el polvo en hielo hasta agregarle el buffer de lisis.
- b. Se agrega al microtubo 350  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis parte A y 50  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis parte B, luego mezclar fuertemente por agitación e inversión. Se agrega 50 unidades de ARNasa (para eliminar el ARN contaminante) luego incubar la mezcla a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos haciendo inversiones ocasionales. Nota: un precipitado blanco puede formarse al agregar el buffer parte B, este se disolverá a  $65^{\circ}\text{C}$ .
- c. Se agrega 130  $\mu\text{l}$  de solución de precipitación (precipitation solution) a la mezcla, se mezcla completamente por inversión y se coloca la muestra en hielo durante 5 minutos.
- d. Se centrifuga la muestra a velocidad máxima (12,000 a 16,000 x g) durante 5 minutos para comprimir los desechos celulares, proteínas y polisacáridos.
- e. Se coloca una columna de filtrado (azúl) en un microtubo de 2 ml. Cuidadosamente se pipetea el sobrenadante obtenido en el paso anterior y se coloca en la columna de filtrado. Se centrifuga a velocidad máxima durante 1 minuto.
- f. Se descarta la columna de filtrado y se agrega directamente al filtrado obtenido en el paso anterior 700  $\mu\text{l}$  de solución de ligamiento. Se mezcla fuertemente por inversión.

- g. Se coloca una columna de ligamiento de ADN (blanca) en un microtubo nuevo, cuidadosamente pipetee 700µl de la mezcla del paso anterior y se coloca en la columna. Se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto. Se descarta el filtrado pero no el microtubo.
- h. Se vuelve a colocar la columna de ligamiento en el tubo y se aplica el remanente de muestra a la columna. Se repite la centrifugación como en el paso anterior y luego se descarta el filtrado y el tubo.
- i. Se coloca la columna de ligamiento en un tubo nuevo, se aplica 500 µl de la solución de lavado a la columna y se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto. Se descarta el filtrado y el tubo. No permitir que la solución de lavado toque la columna, se limpia cualquier líquido que pueda estar adherido en la parte de afuera de la columna.
- j. Se transfiere la columna de ligamiento a un tubo nuevo, se aplica 100µl de TE (previamente calentado a 65°C) se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto.
- k. Se repite el procedimiento del paso anterior.
- l. Para almacenamiento a corto plazo mantener el ADN a 4°C se evita el congelamiento si es posible.

#### 7.4 Cuantificación de Acidos Nucleicos (Determinación Espectrofotométrica)

- A. Se agrega 20 µl de la muestra patrón de ADN en un tubo que contenga 180µl de amortiguador TE o agua bidestilada estéril, se mezcla perfectamente y se lee la absorbencia (DO) en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.
- B. Se calcula la concentración de ADN en la solución de acuerdo a la siguiente fórmula

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = [\text{DO}_{260} \times 100(\text{factor de dilución}) \times 50 \mu\text{g/mL}] / 1000$$

#### 7.5 Preparación de diluciones estándar

Debido a que el proceso de extracción consiste en colocar varios reactivos que cumplen distintas opciones y que el mismo conlleva pasos de filtración y decantamientos es necesario estandarizar la concentración de ADN en todas las muestras a trabajar. Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Donde:  $V_1 = 100 \mu\text{l}$ ;  $C_1 = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  [ ] de ADN<sub>VARIETAL</sub>  $V_2 =$  Volumen de ADN a agregar original a la copia dilución.  $C_2 =$  asignada en espectrofotómetro.

#### 7.6 Determinación de la calidad del ADN en geles de Agarosa

##### A. Preparación de minigel de agarosa

- a. Se sellan los extremos del portageles con cinta adhesiva y se inserta el peine.
- b. Se prepara un gel de agarosa 0.7%, se agrega 0.42 g de agarosa a 60 mL de amortiguador TAE 1X.
- c. Se hierve hasta que la agarosa se disuelva y se enfría la dilución a 60°C.

- d. Se vacía con cuidado la agarosa disuelta en el portageles y se remueven las burbujas usando una pipeta pasteur.
- e. Después de que el gel se halla solidificado, se remueve la cinta adhesiva de los extremos del portageles y se coloca dentro de la cámara de electroforésis.
- f. Se cubre el gel con amortiguador TAE 1X hasta que quede sumergido a 4 mm de profundidad respecto a la superficie del TAE.
- g. Se remueve le peine cuidadosamente evitando que se rompa el gel.

### **B. Colocación de las muestras de ADN en el gel**

- a. En cada muestra de ADN se le adiciona 1/10 del volumen del amortiguador de carga, mezclar con cuidado con la ayuda de la micropipeta y centrifugar de 2 a 3 segundos en la microcentrífuga. El amortiguador de carga ayuda de dos maneras: (1) contiene glicerol que hace a la muestra mas densa que el amortiguador TAE, permitiendo que el ADN se quede en el pozo del gel y (2) debido a su color, es posible seguir el movimiento de las muestras durante la electroforésis.
- b. Se coloca cuidadosamente las muestras de ADN teñidas en el gel, evitando derramarlas en los pozos adyacentes. Asegurarse de incluir una línea con el marcador de peso molecular del ADN (por ejemplo, usar 250 ng de ADN de lambda cortado con Hind III).
- c. Se tapa la cámara de electroforésis y se colocan los electrodos, asegurarse de que la terminal negativa (azul o negra) está en el mismo extremo del aparato. Se enciende la fuente de poder a 80 volts.
- d. Se apaga la fuente de poder cuando el frente del color esté a 2 cm del extremo positivo.

### **C. Tinción y Observación**

- a. Se remueve el gel del aparato de electroforesis y se sumerge en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL en amortiguador TAE 1X) por 30 minutos. Se mantiene el recipiente con el gel en agitación suave.  
*Precaución:* El bromuro de etidio es un potente agente mutagénico y cancerígeno por lo que nunca debe manipularse sin guantes. La solución una vez preparada, puede utilizarse varias veces siempre y cuando se mantenga en la obscuridad y debe colocarse separadamente de otros desechos de laboratorio en recipientes apropiados cuando sea eliminada.
- b. Se observa el gel sobre un transiluminador de luz UV y se documenta en caso necesario (fotografiarlo).  
*Precaucion:* la luz UV es dañina al exponer los ojos y la piel. Al irradiar el gel, deben usarse anteojos especiales o caretas de protección y bata de laboratorio. También este tipo de luz daña el ADN por lo que no debe ser expuesto por largos períodos de tiempo, sino solamente lo necesario.

## 7.7 Procedimiento de Amplificación de Fragmentos de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

### A. Pasos previos

- Se revisa literatura de la técnica, el conocimiento de la misma brinda herramientas para la solución de problemas técnicos.
- Se deben autoclavar suficientes puntas y tubos para PCR.
- Se prepara hielo para colocar reactivos y si es posible las muestras.
- Se conservan micropipetas preferiblemente exclusivas para PCR de RAPDs, las cuales deberán preverse para dispensar distintos volúmenes.
- Se diseña el experimento de tal forma que los reactivos estén a concentraciones adecuadas.
- Se revisó el catálogo de SIGMA, por ser ésta la empresa a la que se le compraron dichos reactivos y se procedió a chequear las especificaciones de los mismos.

### B. Preparación de Reactivos

- Se estima que cantidad total (volumen  $\mu\text{l}$ ) tendrá la muestra a amplificar. Para este caso en particular se decidió preparar únicamente 20  $\mu\text{l}$  por muestra en total. Ya que para el caso de geles de agarosa se necesitan únicamente 5-7  $\mu\text{l}$  de ADN amplificado para su detección.
- Debido a que estos reactivos se encuentran a una solución más concentrada es necesario calcular el volumen de reactivo a tomar para llenar las condiciones.

PCR Buffer 10X

500 mM de KCl y 100 mM Tris HCl .....Solución patrón

Por tanto para cumplir con dicha condición se usa la conocida fórmula

$$V_1C_1=V_2C_2$$

**Donde:**  $V_1$  corresponde al volumen a tomar de solución patrón para preparar un Master Mix con las condiciones de 10mM de Tris-HCl y 50 mM de KCl.  $C_1$  corresponde a la concentración de la solución patrón.  $V_2$  cantidad total ( $\mu\text{l}$ ) a amplificar y que se estima suficiente para protocolos posteriores.  $C_2$  corresponde a la concentración precisa para el Master Mix.

$$V_1 \times 500\text{mM KCl} = 25 \mu\text{l} \times 50 \text{ mM KCl}$$

$$V_1 = 2.5 \mu\text{l}$$

$$V_1 \times 100 \text{ mM de Tris-HCl} = 25 \mu\text{l} \times 10 \text{ mM Tris-HCl}$$

$$V_1 = 2.5 \mu\text{l}$$

De esa manera fueron calculados todos los componentes del PCR y se someten a evaluación. El volumen total y las concentraciones fueron estandarizados para cada uno de los componentes del PCR.

### C. La solución de reacción

|                           |        |     |  |
|---------------------------|--------|-----|--|
| Buffer 10x                | 2.5µl  | c/u | [10 mM Tris-HCl y 50 mM KCl]                               |
| MgCl <sub>2</sub>         | 3.0µl  |     | [1.5 mM]   |
| Primer                    | 2.0µl  |     | [5µM] [OPAC5, AA10, A01, AB11, AB7, B7, C19, AB5, D2, A04] |
| DNTPs                     | 0.4µl  |     | [200µM c/u, 800µM]   |
| ADNcaña                   | 3.0µl  |     | [2 ng]   |
| Taq Sigma                 | 0.1µl  |     | [0.5U]   |
| H <sub>2</sub> Odestilada | 4.0µl  |     | [Ultra Pura]   |
| Aceite Mineral            | 25.0µl |     | [de último para evitar evaporación]                        |

Así que como son 41 las variedades analizadas se preparo un Master Mix para 50 variedades, esto específicamente para cada uno de los primers o iniciadores evaluados.

#### Nota>

La preparación de la solución de reacción es sumamente importante para el éxito en la amplificación, de tal forma que hay que tener los siguientes cuidados:

- Se espera a que se descongelen los reactivos para poder tomar de los mismos la cantidad adecuada, pues de lo contrario variará la concentración que contiene el reactivo stock.
- Se sugiere agregar los reactivos en el siguiente orden: Agua, Buffer, MgCl<sub>2</sub>, Primer, dNTPs, Taq polimerasa y por último el ADN que será distribuído posteriormente a cada uno de los tubos conteniendo los componentes de PCR.
- La enzima Taq ADN polimerasa posee una estructura muy débil, por lo que no se recomienda hacerle paso de vortex, por el contrario con los demás reactivos es preciso hacerles pasos subsecuentes de vortex para que se homogenice.
- Una vez preparadas todas las reacciones para analizar nuestros materiales se recomienda encender el termociclador para su previo calentamiento y luego se programa para que éste cumpla con las condiciones de temperatura anteriores (éste programa deberá grabarse en memoria para evitar reprogramarlo cada vez que se utilice).

#### D. Ciclo Térmico (Termociclador MJ Research, Inc. PTC100™)

|        |   |            |          |
|--------|---|------------|----------|
| Step 1 | 91°C... Desnaturalización del ADN.        | 120s       | Ciclo 1  |
| Step 2 | 42°C... Alineamiento del oligonucleotido. | 15s        |          |
| Step 3 | 72°C... Síntesis de molécula.             | 70s        |          |
| Step 4 | 91°C                                      | 15s        | Ciclo 2  |
| Step 5 | 42°C                                      | 15s        |          |
| Step 6 | 72°C                                      | 70s        |          |
| Step 4 | 91°C                                      | 15s        | Ciclo 3  |
| Step 5 | 42°C                                      | 15s        |          |
| Step 6 | 72°C                                      | 70s        |          |
| .....  |   |            | Ciclo 39 |
|        | 4°C                                       | Permanente | Ciclo 40 |

El programa contiene 39 ciclos de temperatura y un último paso en el cual se queda a 4°C para permitir que las muestras amplificadas se conserven mientras el investigador las traslada a un refrigerador a -20°C, para su posterior análisis en electroforésis.

#### **E. Consideraciones**

Para RAPDs es necesario optimizar cada una de las condiciones (reactivos, ciclos térmicos, etc) y no modificarlo. Ya que es bastante susceptible a variaciones del protocolo.

En caso de que no se tenga éxito, será preciso analizar cual fue la causa o causas que provocaron el fracaso, modificarlas o bien corregirlas y continuar evaluando cada una de las condiciones que impiden el éxito, para ello se utilizan únicamente unas 3 variedades, modificando el factor que en base a experiencia y soporte se cree que está impidiendo la reacción, obviamente con ello se ahorra reactivos y se maneja las condiciones del experimento con más precisión.

#### **7.8 Separación de fragmentos de ADN por electroforésis en geles de agarosa**

- A. Se sellan los extremos del portageles con una cinta y se inserta el peine (molde) adecuado.
- B. Se colocan 400 mL de TAE 1X en un matraz de 1,000 mL, se adiciona la agarosa necesaria según el porcentaje que se trabaje.
- C. Se hierve la mezcla brevemente y se enfría hasta 60°C.
- D. Se vacía la solución de agarosa cuidadosamente dentro del portageles y se remueve las burbujas de aire usando una pipeta pasteur.
- E. Después de que el gel ha solidificado completamente, se remueve el peine y retira la cinta que sirvió para sellar los extremos, posteriormente se sumerge dentro de una cámara de electroforesis.
- F. Se adicionan 2 L del amortiguador para la electroforesis TAE 1X o la cantidad necesaria para que el gel esté completamente cubierto (el amortiguador debe quedar 2 a 4 mm sobre el gel).

#### **7.9 Colocación de muestras de ADN en el gel**

A. Se agregan 1/10 de volumen del amortiguador de carga 10X a cada una de las muestras del ADN. Mezclar con la punta de la micropipeta durante 2 a 3 segundos.

B. Se colocan las muestras en cada uno de los pozos del gel, sin derramarla en los pozos adyacentes.

C. Se incluye en un carril el marcador de peso molecular del ADN (usar 500 ng de Hind III).

**Nota:** La cantidad de muestra que debe ser colocada en los pozos depende del grosor del gel, así como de las dimensiones del peine que se utilice.

D. Se tapa la cámara de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de poder. La terminal del catodo (negra) es el punto de referencia en donde se colocan las muestras en el gel.

E. Se enciende la fuente de poder a 30 V por 18 horas (o toda la noche) o bien a 100 voltios por 3 horas.

### 7.10 Tinción con Bromuro de Etidio

A. Después de la electroforesis se remueve cuidadosamente el gel de agarosa del portageles y se transfiere a otro recipiente. Se cubre el gel con amortiguador para electroforesis que contenga 0.4-1.0  $\mu\text{g/mL}$  de bromuro de etidio. Se coloca el recipiente en la obscuridad y se agita suavemente durante 15-30 minutos. (Es recomendable que coloque una seña en las esquinas del gel para identificarlos).

B. Cuidadosamente se decanta la solución de bromuro de etidio en un recipiente apropiado y se adiciona agua destilada para desteñir el gel. Se Mantiene el recipiente en agitación suave nuevamente durante 15 minutos.

### 7.11 Registro de Datos

A. Se recortó nylon transparente a fin de utilizarlo para cubrir la pantalla del transiluminador de luz UV, se coloca cuidadosamente evitando que entre el mismo se formen burbujas ya que de lo contrario estas se visualizarán en las fotografías.

B. Luego de transcurrido el tiempo necesario para que los excesos de bromuro de etidio sean retirados, se colocó cuidadosamente el gel sobre la pantalla del transiluminador.

C. Se cierra el vidrio protector y se debe colocar la mascarilla específica para la exposición de la luz ultravioleta. Se recomienda a la vez utilizar bata y guantes para proteger la piel de exposiciones.

D. Observe el gel y trate de interpretar los resultados.

E. Si el mismo amerita se registran los datos, fotografiándolos. La cámara utilizada para el efecto fue una Polaroid Instantánea, Blanco y Negro con filtro para luz UV.

F. Usando como base las fotografías de las bandas de fragmentos de ADN se dibujó en acetatos las bandas con el objeto de facilitar la construcción de una matriz de presencia-ausencia para cada uno de los cebadores (primers).

G. Se obtuvieron los índices de similitud genética (Según Dice, 1999) utilizando el programa NTSY's 2.1 de CENGICAÑA.

H. Se generó un Dendrograma utilizando UPGMA del programa NTSYS's 2.1 sumalizando la información de todos los cebadores.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ISSCT Germoplasm and Breeding Committee a través COPERSUCAR identifica mediante un proceso de inscripción legal, con el uso de siglas, a que programa de cruzamiento pertenece. Aunque los progenitores sean únicamente introducidos, reconoce la propiedad intelectual para cada centro de mejoramiento en el mundo. Por tanto, existe agrupamiento de acuerdo al lugar geográfico donde fueron generados y no a centros de origen.

Los 41 materiales seleccionados presentan las siguientes características: diferencias morfológicas apreciables además de las diferencias respecto a origen e historial, pertenecen a 12 países, son exitosas como progenitores en otros programas de cruzamiento a nivel mundial, se cultivaron y cultivan con éxito en Guatemala y son promisorias del programa CENGICAÑA.

En el proceso de importación de reactivos tuvo pequeños atrasos debido a la validación de la información respecto al tipo de reactivos, convirtiéndose en una actividad burocrática. Debe contemplarse para futuras adquisiciones debido a que los productos son importados en hielo seco el cual tiene poca duración. Por ello en el proyecto se creó un período para verificar el estado de los mismos.

El kit de extracción de ADN distribuido por la casa SIGMA contenía reactivos y equipo necesario para analizar 50 variedades permitiendo un proceso poco laborioso, rápido. De tal forma que el procedimiento Dellaporta aunque es más económico resulta más laborioso, y principalmente se requiere pericia para la colecta arriesgándose a el fraccionamiento de la molécula. La selección del meristemo apical resultó bastante adecuada debido a que dicho tejido aún no cuenta con sistema vascular por tanto se evitó la presencia de virus.

De acuerdo con los resultados obtenidos del espectrofotómetro a 260 nm las concentraciones de ADN oscilaron desde 1.35-3.95  $\mu\text{g/ml}$  suficientes para iniciar un análisis de esta naturaleza, el análisis espectrofotométrico de barrido ubico a 4.7 en una longitud de 229.5 nm y valores abajo de 0.5 tan solo aquellos ubicados en 264.5nm de tal forma que permite ver que la mayor concentración del producto analizado es ADN y no otro material que absorbe longitudes de onda mas elevados, denotando de esta manera la pureza del material.

La integridad del ADN fue realizado con un gel de agarosa mostrando resultados altamente satisfactorios. Posteriormente se planificó una dilución de ADN ubicados a 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$  para las 41 variedades en estudio.

La reacción PCR-RAPD's fue quizá el punto crítico de la evaluación. Debido a que en términos generales existen recomendaciones acerca de la cantidad y concentraciones para cada reactivo, pero existen tips de manejo de esos factores que pueden dar como resultado la no amplificación. Obligando evaluar modificaciones hasta estandarizar la técnica para las condiciones del laboratorio y del material analizado. Las reacciones fueron realizadas en el Laboratorio de Citohistología de la Facultad de

Farmacia de la USAC, debido a que en dicho momento el termociclador de la Facultad de Agronomía se encontraba en mal estado, ello obligó a realizar una reacción/día hábil. De tal manera que la estandarización consumió más tiempo de lo planificado. En última instancia era posible alcanzar amplificaciones con pocas muestras, pero al pretender el análisis de las accesiones completas éste ya no tenía éxito. Sin embargo, denotaba que los reactivos se encontraban en buen estado y que probablemente era cuestión de pericia.

El principal problema ocurrió cuando producto de las pruebas la cantidad de Taq ADN polimerasa SIGMA se terminó. De tal forma que se utilizó Taq ADN polimerasa preparada por personal del anteriormente mencionado laboratorio de Citohistología, que a pesar del alto costo del reactivo el mismo fue donado. Iniciando una nueva etapa de estandarización. Otro detalle importante acerca de la Taq ADN polimerasa es que fácilmente se fracciona. Por lo que producto del presente trabajo debe considerarse únicamente una inversión suave en la preparación de la solución de reacción, comúnmente es mezclado utilizando brotex, por ello dicha experiencia debe contemplarse.

La estandarización de la técnica en la presente evaluación permitió la amplificación de 10 iniciadores o cebadores (OPC-19, OPB-7, OPAC-5, OPAB11, OPAB-7, OPAB-5, OPAA-10, OPA-04, OPA-01, OPD-2) con el consecuente análisis de 41 variedades en términos generales. Los iniciadores OPAC-5, OPB-7, OPAB-11, Y OPC-19 fueron los analizados por León, et al., 2001. fueron tomados en cuenta debido a los resultados de polimorfismo alcanzados. Otro estudio de ADN realizado por Quemé, et al., 2004 en CENGICANÑA utilizó 6 pares de primers para microsátélites desarrollados por el CIRAD (mSSCIR27, mSSCIR32, mSSCIR34, Msscir38, mSSCIR52 y mSSCIR77). Cada uno de los cebadores utilizados en el presente estudio fue capaz de detectar polimorfismo, mostrando en promedio 28 bandas polimórficas, con un total de 275 bandas polimórficas en los iniciadores amplificados. Y "cero bandas" en las muestras testigo, por tanto, una caracterización libre de influencia ambiental, alcanzando con los cebadores OPAB-11, OPA-04, y OPD-2 el 100% de accesiones amplificadas y con el cebador OPAB-7 un 75% de las accesiones amplificadas, por lo cual fue incluido. León en su estudio ubicó 4 fragmentos polimórficos por iniciador, con un total de 57 bandas polimórficas en los iniciadores amplificados, por otro lado con Microsátélites Quemé ubica a mSSCIR52 con 518 bandas y mSSCIR77 con 140 bandas entre las 48 variedades, con un promedio de 25 bandas por variedad.

El grado de confiabilidad en la detección de la variabilidad depende el número de marcadores que se utilice sin embargo, los utilizados se consideran como adecuados para la detección de polimorfismos.

Con ello se construyeron las matrices de presencia-ausencia/cebador, a las cuales se practicó un análisis multivariado utilizando el programa NTSYS-pc que calculó el coeficiente de Dice en cada variedad con respecto al resto de variedades/primer, logrando por tanto, la estimación de 861

combinaciones/primer, encontrando promedios de similitud de: 0.61 en el iniciador OPAB-11, 0.60 (OPA-01), 0.42 (OPD-2), 0.40 (OPC-19), 0.39 (OPAC-5), 0.37 (OPA-04), 0.35 (OPAA-10), 0.33 (OPAB-5), 0.32 (OPB-7) y 0.24 (OPAB-7). Siendo los últimos 5 cebadores los que más información proporcionaron de acuerdo al objetivo del estudio, por lo que para subsecuentes evaluaciones, se pueden contemplar.

Fue preciso integrar la información a través de la unión de las matrices de presencia-ausencia para estimar un coeficiente Dice general, eludiendo el peso específico de las bandas y concretándose a chequear únicamente diferencias en la región amplificada. El promedio general de similitud alcanzado mediante el análisis fue de 0.46, incluyendo la oportunidad de que las variedades puedan ser combinadas consigo mismas. Y descartando dicha oportunidad, contamos con 820 combinaciones que en promedio indicaron 0.43, con valores máximos de 0.74 y mínimos de 0.17. Esto se debe a el origen común que tienen las variedades en estudio o a la fracción de ADN muestreado. El promedio general de similitud ubicado por León fue de 75.6% (27.59-93.88%) y Quemé encuentra valores entre cada par de variedades entre 0 y 0.52. Sin embargo, la relación indica que existe diversidad de ADN entre las variedades evaluadas y que puede ser aprovechada para explotar heterosis o para la combinación de características deseables. Partiendo de la importancia de la variabilidad en los programas de mejoramiento los bajos valores de similitud fueron encontrados entre las combinaciones: CG96-28 x MZC74275 (0.17); CG96-28 x CC8563, CG96-28 x CP881508, CG96-28 x CP722086 (0.21); CG96-28 x JA64-20, CG96-28 x CC8475, CG96-28 x CP72-1210, CG97-97 x CP72-2086, CG96-59 x Q96 (0.22); CGCP95-55 x MZC74-275, CG97-97 x CP57-603 (0.23); CG97-97 x PR75-2002, CG96-28 x PR75-2002, CG96-28 x JA64-19, CG97-83 x CP63588, CG96-28 x Q96, CG96-59 x CP88-1508, CG96-59 x P33-11 (0.24); MY74-64 x CG96-40, CGCP9555 x JA64-20, CG97-97 x JA64-20, CG97-97 x Q96, CG97-83 x CP881508, CG96-52 x Q96, CG96-143 x MZC74-275, CG96-28 x Mex69-290, CG96-59 x CP72-1210 (0.25). Por otro lado los cruzamientos más emparentados (de acuerdo al Coeficiente Dice) son: CP72-1210 x CP72-2086 con coeficiente de 0.74; L64-40 x CP65357, P33-11 x CP65357 (0.73); PR87-2048 x PR78-3025, CB46-47 x CP88-1165 (0.72); CG96-52 x CG96-143 (0.71); CG96-40 x CB46-47, CP70-1133 x CP63-588 (0.70). Del programa NTSYSpc se agrupó al vecino más cercano, a través de la construcción de un dendrograma utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method, using arithmetic average) que utilizó como raíz la matriz de presencia-ausencia obtenida de los 10 cebadores analizados.

Dividiendo el dendrograma en un valor de 0.54, se formaron 9 grupos de acuerdo con su similitud genética, pero que sin embargo tendieron a agruparse de acuerdo con el lugar geográfico donde se generaron: El grupo I, Ubica principalmente un 75% de accesiones estadounidenses, así como las accesiones incluidas de Barbados, Filipinas y Australia. El grupo II, la accesión de Java. El grupo III, ubicó el 100% de variedades colombianas y de Coimbatore. El grupo IV, ubica principalmente el 100% de las puertorriqueñas. Los grupos contenidos del V al VIII, ubican el 61% de variedades guatemaltecas. Y el

grupo IX, algunas accesiones disímiles al grupo procedentes de Guatemala, Cuba y Brasil. León según el análisis de conglomerados realizado ubicó 7 grupos, Quemé por su parte a partir del fenograma construido producto del análisis de microsátélites ubica 25 grupos, ello utilizando NTSYSpc 2.1 con lo cual aunque la población bajo estudio fue distinta resalta la capacidad de microsátélites para análisis de variabilidad de poblaciones.



## 9. CONCLUSIONES

- 9.1 El Kit de extracción de ADN genelute SIGMA permite fácilmente analizar suficiente cantidad de ADN con elevada pureza e integridad requerida para análisis RAPD`s.
- 9.2 La técnica RAPD`s es una técnica muy sensible a alteraciones del protocolo, pero, estandarizando las condiciones, éste resulta técnicamente conveniente y de bajo costo.
- 9.3 La técnica RAPD`s a través de la utilización del coeficiente de Dice permitió la identificación de progenitores contrastantes, lo cual servirá como herramienta complementaria en la selección de progenitores en el Programa de Variedades de CENGICAÑA.
- 9.4 La utilidad de la información es maximizada cuando analiza el resultado de los iniciadores evaluado y no el iniciador por si solo. Contar con mayor información permite la construcción de un dendrograma más real.
- 9.5 El dendrograma generado a partir del análisis practicado al ADN de la población hizo agrupamientos de acuerdo al lugar geográfico donde se generaron, sin embargo, permiten apreciar las diferencias existentes entre las variedades generadas en un mismo país.
- 9.6 Tanto los valores de similitud de Dice como las relaciones genéticas mostradas en el dendrograma fueron técnicamente construidas.

## 10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Utilizar como base para siguientes estudios en caña de azúcar, la estandarización alcanzada de los componentes del PCR-RAPD's, incrementando, en lo posible el número de cebadores para amplificar más regiones del ADN tratado.
- 10.2 Debido a que las variedades CG96-28, CG97-97, CG96-59, CG 97-83, CG96-143, CGCP9555 y My7464 mostraron valores de 0.17 a 0.25 de similitud, se recomienda incluirlos como posibles "cruzas biparentales" en la siguiente campaña de cruzamiento de CENGICAÑA, sin descartar la usarlas como hembras y formular un sistema de "policruzas".
- 10.3 Se recomienda que para la selección de los progenitores el criterio sea efectuar cruzamientos entre individuos de los diferentes grupos sin excluir la posibilidad de que, de acuerdo con la experiencia del fitomejorador, se seleccionen algunos individuos dentro de algunos de los grupos para ser cruzados entre sí.
- 10.4 De igual manera, contemplar una técnica con la que sea factible obtener resultados repetitivos para sondear bandas asociadas a características de importancia agronómica o bien para patentar los materiales a nivel mundial.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Almeida, CG. 1984. Utilicao de marcadores moleculares generados con la técnica de PCR na identificao de variedades e no mapeamento de genes de interesse agronomico em cana-de-acucar. *In* Seminario de Tecnología Agronómica (6., 1984, Sao Pablo, Brasil). Memoria. Sao Pablo, Brasil, COPERSUCAR. p.173-177.
2. Arai, N. 2000. Curso de biología molecular. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 17 p.
3. Arredondo, PR. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología molecular. México, UNAM, Boletín de educación bioquímica no 1:p. 3-14.
4. AZASGUA (Asociación de Azucareros de Guatemala, GT). 1999. Informe anual zafra 1998-1999. Guatemala. 67 p.
5. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT). 2003. Memoria: presentación de resultados de investigación zafra 2002-2003. Guatemala. 177 p.
6. Comide, MT; Gálvez Rodríguez, G. 1999. Los marcadores moleculares y el programa de mejoramiento de la caña de azúcar. *In* Arencibia, AD; Comide, MT. 1999. Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. Cuba. p. 45-62.
7. D'Hont, A; Glazmann, HCh. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane a complex polyploidy of the andropogoneae tribe. *Genome* 37:222-230.
8. Daniels, J; Roach, BT. 1987. Taxonomy and evolution in sugarcane improvement through breeding. Holanda, Elsevier. p. 7-84.
9. Dellaporta, S.1983. A plant DNA minipreparation. *Plant. Mol. Biol.* 1:19-21.
10. Eksomntramage, T. 1992. Utility of isozymes in sugar cane breeding. *Sugar Cane* 3:14-21.
11. Gallego, G; Gallego, E. 1991. Reacción en cadena de la polimerasa PCR. background: genética molecular para el inventario y la caracterización de la biodiversidad. Colombia, CIAT. p. 35-37.
12. Glazmann, JCh; D'Hont, A. 1999. Análisis molecular de la diversidad del germoplasma en caña de azúcar. *In* Arencibia, AD; Cornide, MT. Biodiversidad y biotecnología de la caña azúcar. Cuba. p. 25-44.

13. Grassl, CO. 1971. Taxonomy of *Saccharum* relatives: *Sclerostachya*, *Narenga*, and *Erianthus*. In Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists (14., 1971, New Orleans, US). Proceedings. US, Franlin. p. 240-248.
14. Grivert, L. 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142:987-1000.
15. Harvey, M. 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. In Congress of South African Sugar Technologist Association (68., 1994, Durban Mount, Edgcombe). Proceedings. Sudáfrica, Kohler Carton. p. 36-40.
16. Heinz, DJ. 1969. Isozyme prints for variety identification. *International Society of Sugar Cane Technologist Sugar Cane Breeders Newsletter* 24:8.
17. Hirano, R. 2000. Manual de biología molecular para principiantes: fundamentos teóricos y prácticos para la manipulación de ADN vegetal. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 45 p.
18. Johns, MA. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science* 37:605-613.
19. Kornberg, A. 1970. La síntesis del ADN. In *La célula viva; selecciones de Scientific American*. 2 ed. Madrid, España, Blume. p. 223-242.
20. Leon, LF. 2001. Utilización de marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPDs) para la detección de la variación genética en 39 genotipos de caña de azúcar (*Saccharum* spp). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 58 p.
21. Lu, YH. 1994. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maite nuclear probes. *Euphytica* 78:7-18.
22. Nair, VN. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46:73-79.
23. Orozco, H. 2003. Evaluación de variedades en la cuarta prueba regional de CENGICAÑA en plantía y primera soca: presentación información técnica; semana científica, Guatemala, Pantaleón. 1 CD.
24. Otero Amaiz, A; CRUZ, M De la; Oyama, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. México* 60: 85-117.

25. Pappa, F. 2002. La agroindustria azucarera de Guatemala: principales características según International Sugar Organization -ISO-, Quarterly Market Review, (correspondencia personal). Guatemala, Ingenio Pantaleón, Recursos Humanos.
26. Powell, W. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm análisis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
27. Quemé, JL; Molina, L; Melgar, M. 2001. Analysis of the similarity genetic amoughth 48 varieties of sugar cane using secuense DNA microsateellites. Guatemala, CENGICAÑA. 6 p. Sin publicar.
28. Ramírez, H; Calderón, A; Roca, WM. 1989. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar germoplasma vegetal. *In Cultivo de tejidos en la agricultura*. Cali, Colombia. p. 826-855.
29. Sánchez, A; Cassalett, C. 1997. Caracterización molecular de variedades de caña de azúcar: una aproximación a la identificación de materiales en campo. *In Congreso Colombiano de la Asociación de Técnicos de la Caña de Azúcar (4., 1997, Cali, Colombia)*. Memoria. Cali, Colombia, TECNICAÑA. p. 11-17.
30. Silio, L; Gallego, F. 2001. Curso de formación de formadores sobre marcadores genéticos en agricultura y ganadería. Antigua Guatemala, Guatemala, Agencia Española de Cooperación Internacional. 1 CD.
31. Soto, G; Orozco, H; Ovalle, W. 1998. Desarrollo de variedades de caña de azúcar en Guatemala: reporte del progreso a junio de 1998. Guatemala, CENGICAÑA. p 22.
32. Soto, G; Orozco, H; Ovalle, W. 1999. Censo de variedades de caña de azúcar en Guatemala, análisis comparativo de las últimas dos décadas y comparación con otras industrias azucareras. Guatemala, CENGICAÑA. p 14.
33. Subiros Ruiz, F. 1975. El cultivo de la caña de azúcar. San José, CR, EUNED. p. 1-15.
34. Valdez Moctezuma, E; Kahl, G. 1995. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos ). México, Universidad Autónoma de Chapingo / Mundi-Prensa. 146 p.
35. Williams, JG. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefual as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.

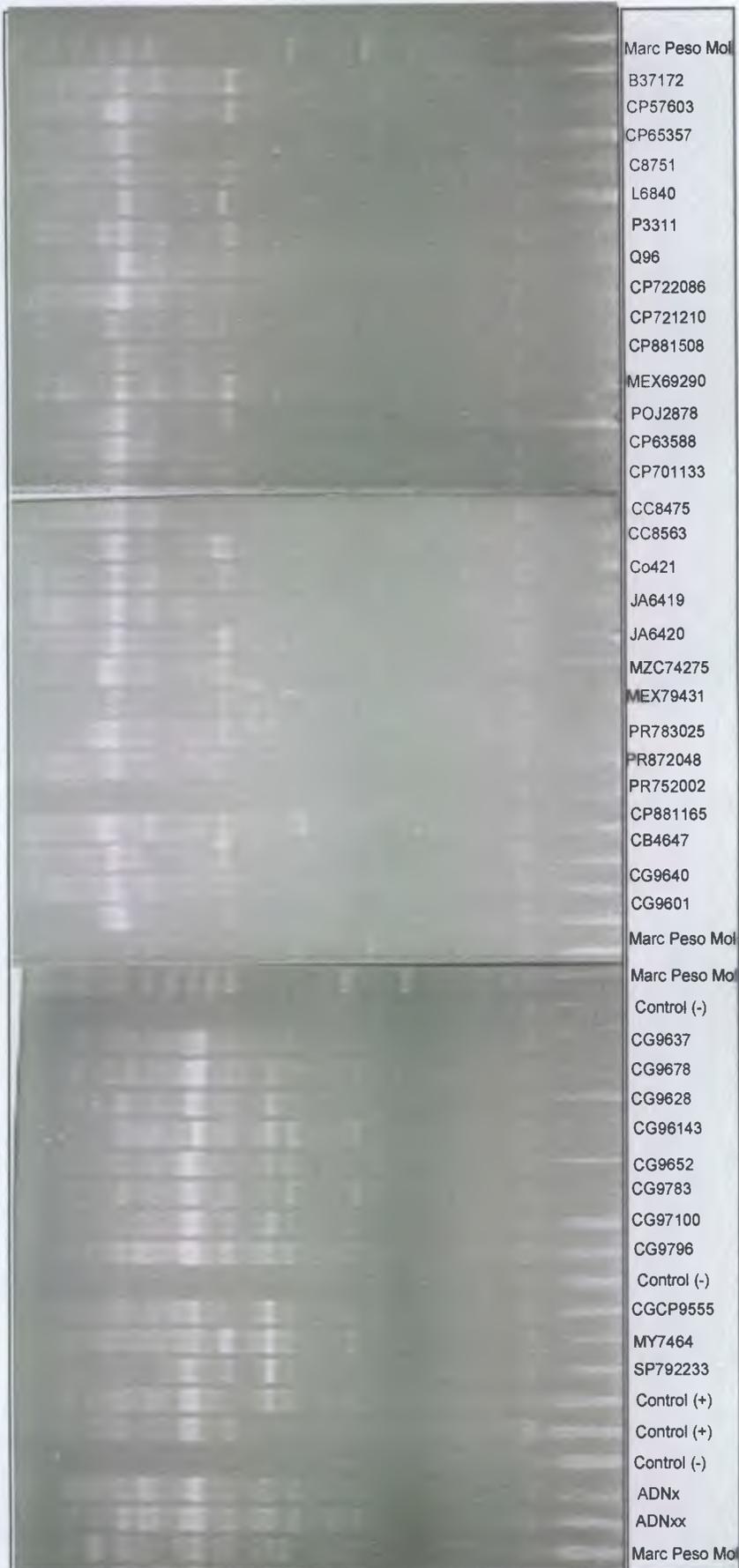
Vo. Bo. Rolando Barrios

**ANEXOS**

*Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando iniciadores Operon y la técnica de marcadores moleculares RAPD's*



Figura 5. Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador de Operon C19 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's



Marc Peso Mol

- B37172
- CP57603
- CP65357
- C8751
- L6840
- P3311
- Q96
- CP722086
- CP721210
- CP881508
- MEX69290
- POJ2878
- CP63588
- CP701133
- CC8475
- CC8563
- Co421
- JA6419
- JA6420
- MZC74275
- MEX79431
- PR783025
- PR872048
- PR752002
- CP881165
- CB4647
- CG9640
- CG9601

Marc Peso Mol

Marc Peso Mol

- Control (-)
- CG9637
- CG9678
- CG9628
- CG96143
- CG9652
- CG9783
- CG97100
- CG9796
- Control (-)
- CGCP9555
- MY7464
- SP792233
- Control (+)
- Control (+)
- Control (-)
- ADNx
- ADNxx

Marc Peso Mol

Figura 6. Patrones de electroforesis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador de Operon B7 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's



Marc. Peso Mol

B37172  
 CP57803  
 CP65357  
 C8751  
 L8840  
 P3311  
 Q96  
 CP722086  
 CP721210  
 CP881508  
 MEX89290  
 POJ2878  
 CP63588  
 CP701133

CC8475  
 CC8563  
 Co421  
 JA6419  
 JA6420

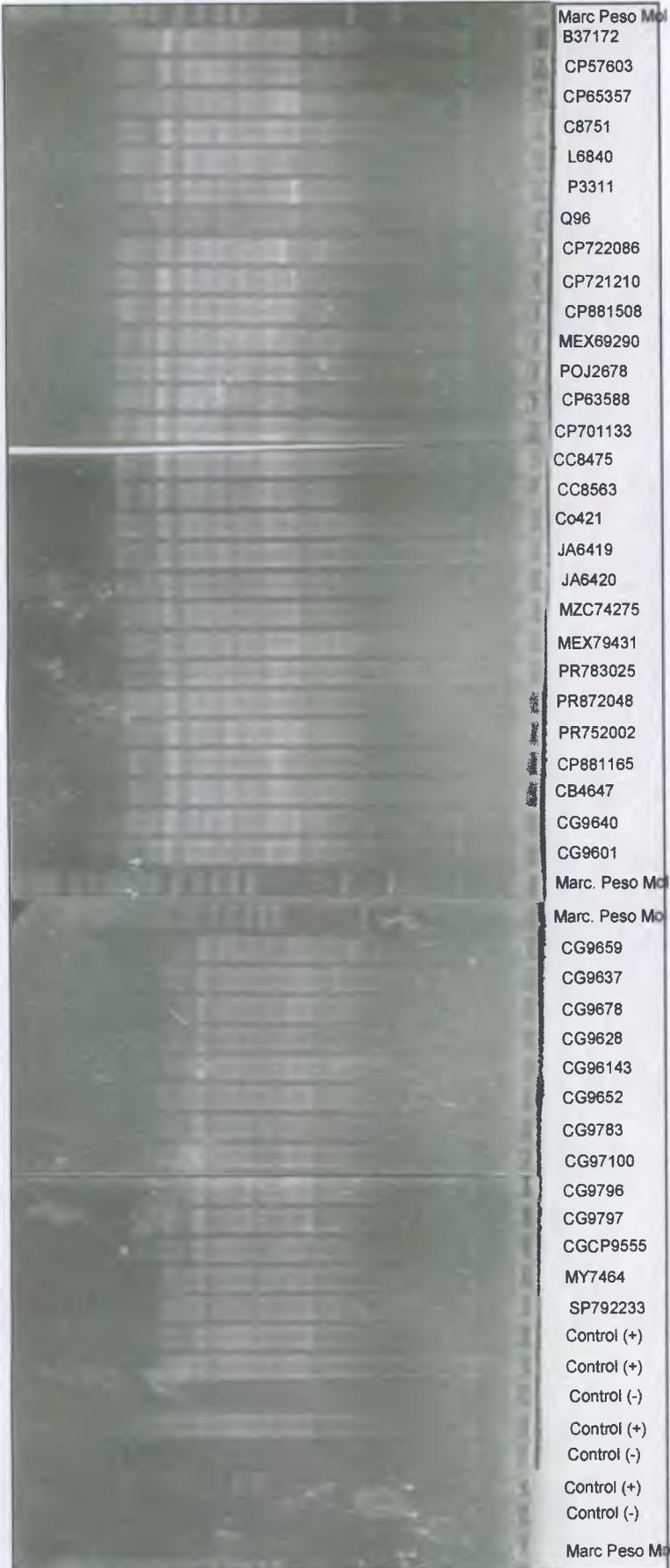
MZC74275  
 MEX79431  
 PR783025  
 PR872048  
 PR752002  
 CP881185  
 CB4647  
 CG9640  
 CG9601

Marc. Peso Mol

Marc. Peso Mol

CG9659  
 CG9637  
 CG9678  
 CG9628  
 CG96143  
 CG9652  
 Control (-)  
 CG97100  
 CG9796  
 CG9797  
 CGCP9555  
 MY7464  
 SP792233  
 Control (-)

Figura 7. Patrones de electroforesis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICANA utilizando el iniciador de Operon AC5 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's



Marc Peso Mol  
 B37172  
 CP57603  
 CP65357  
 C8751  
 L6840  
 P3311  
 Q96  
 CP722086  
 CP721210  
 CP881508  
 MEX69290  
 POJ2678  
 CP63588  
 CP701133  
 CC8475  
 CC8563  
 Co421  
 JA6419  
 JA6420  
 MZC74275  
 MEX79431  
 PR783025  
 PR872048  
 PR752002  
 CP881165  
 CB4647  
 CG9640  
 CG9601  
 Marc. Peso Mol  
 Marc. Peso Mol  
 CG9659  
 CG9637  
 CG9678  
 CG9628  
 CG96143  
 CG9652  
 CG9783  
 CG97100  
 CG9796  
 CG9797  
 CGCP9555  
 MY7464  
 SP792233  
 Control (+)  
 Control (+)  
 Control (-)  
 Control (+)  
 Control (-)  
 Control (+)  
 Control (-)  
 Marc Peso Mol

Figura 8. Patrones de electroforesis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador de Operon AB11 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's

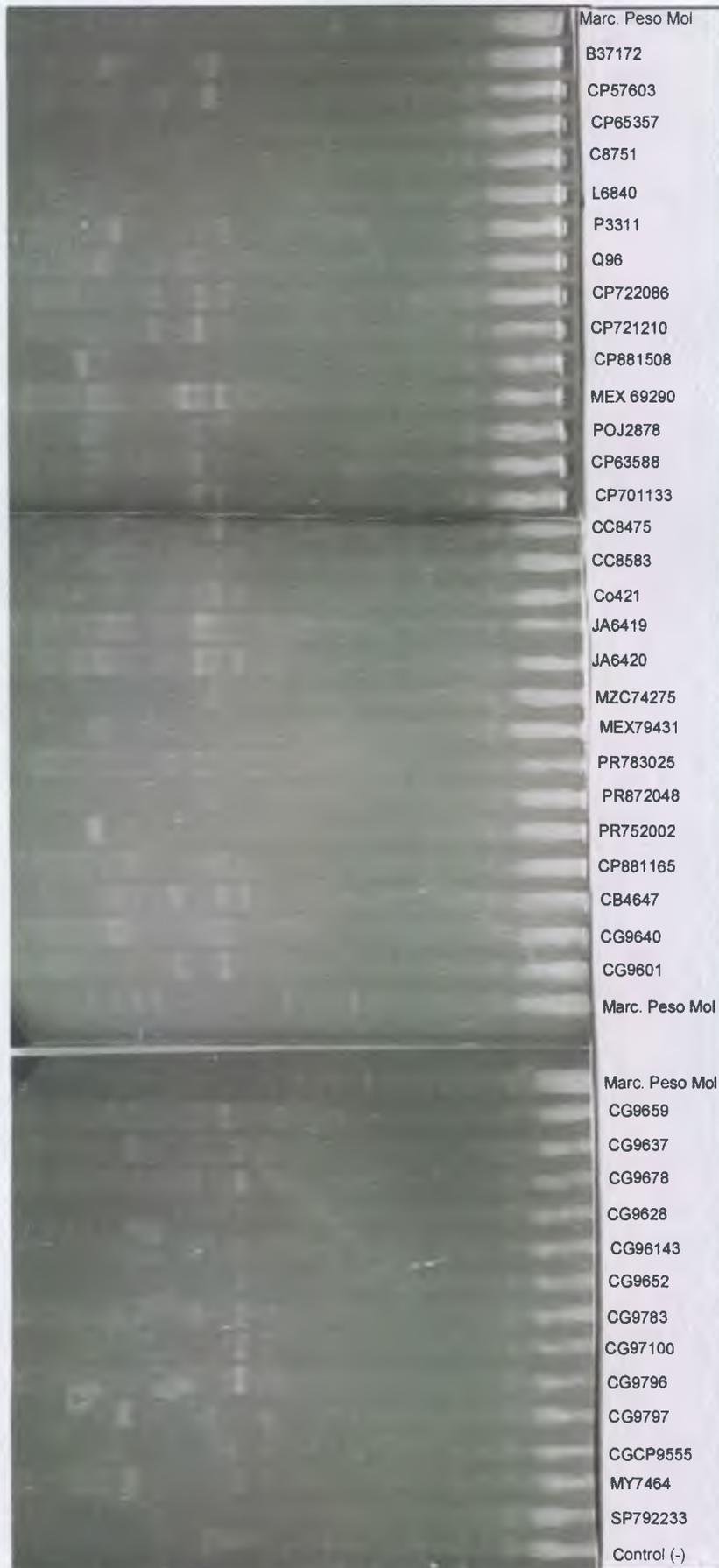


Figura 9. Patrones de electroforesis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICANA utilizando el iniciador de Operon AB7 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's

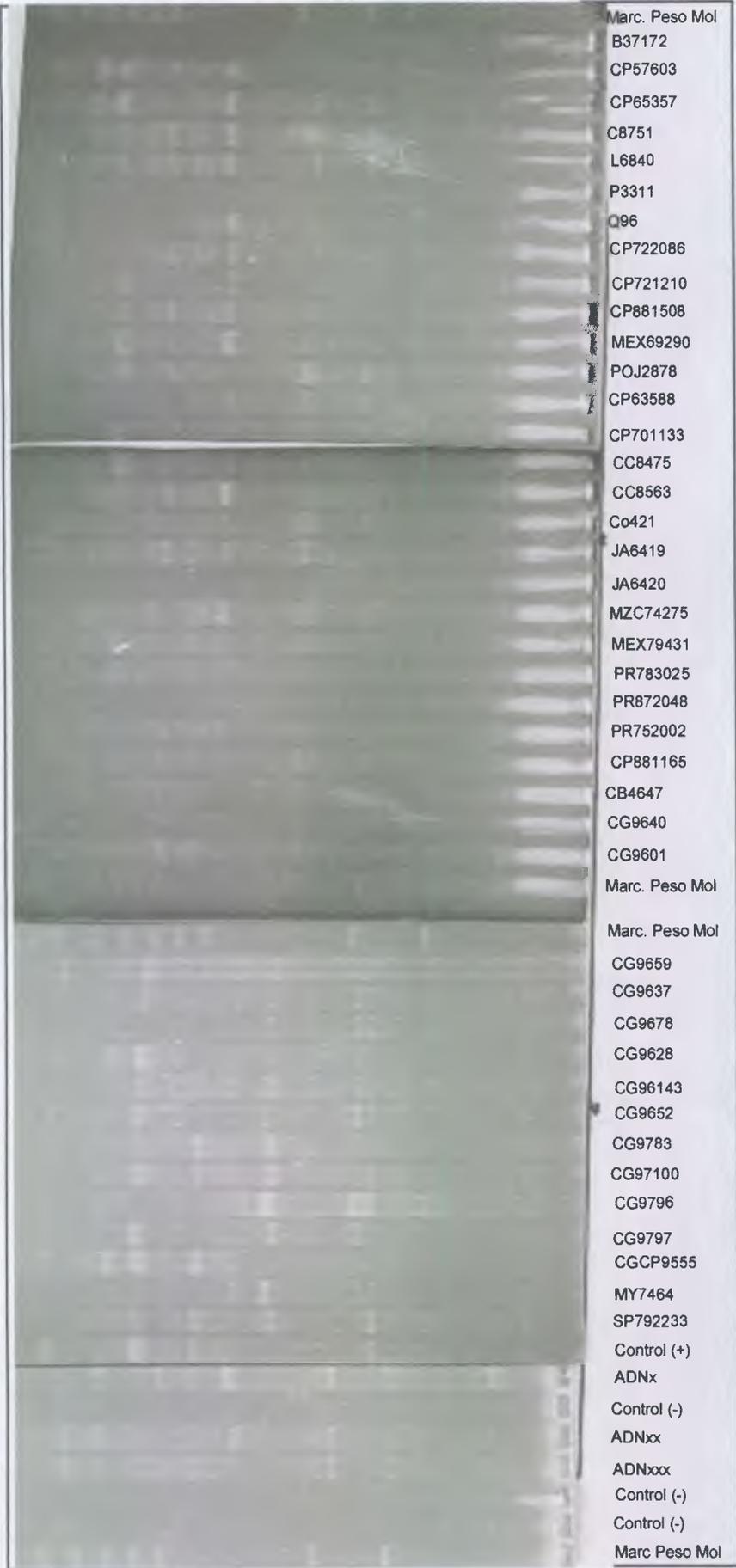


Figura 10. Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICAÑA utilizando el iniciador de Operon AB5 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's

□

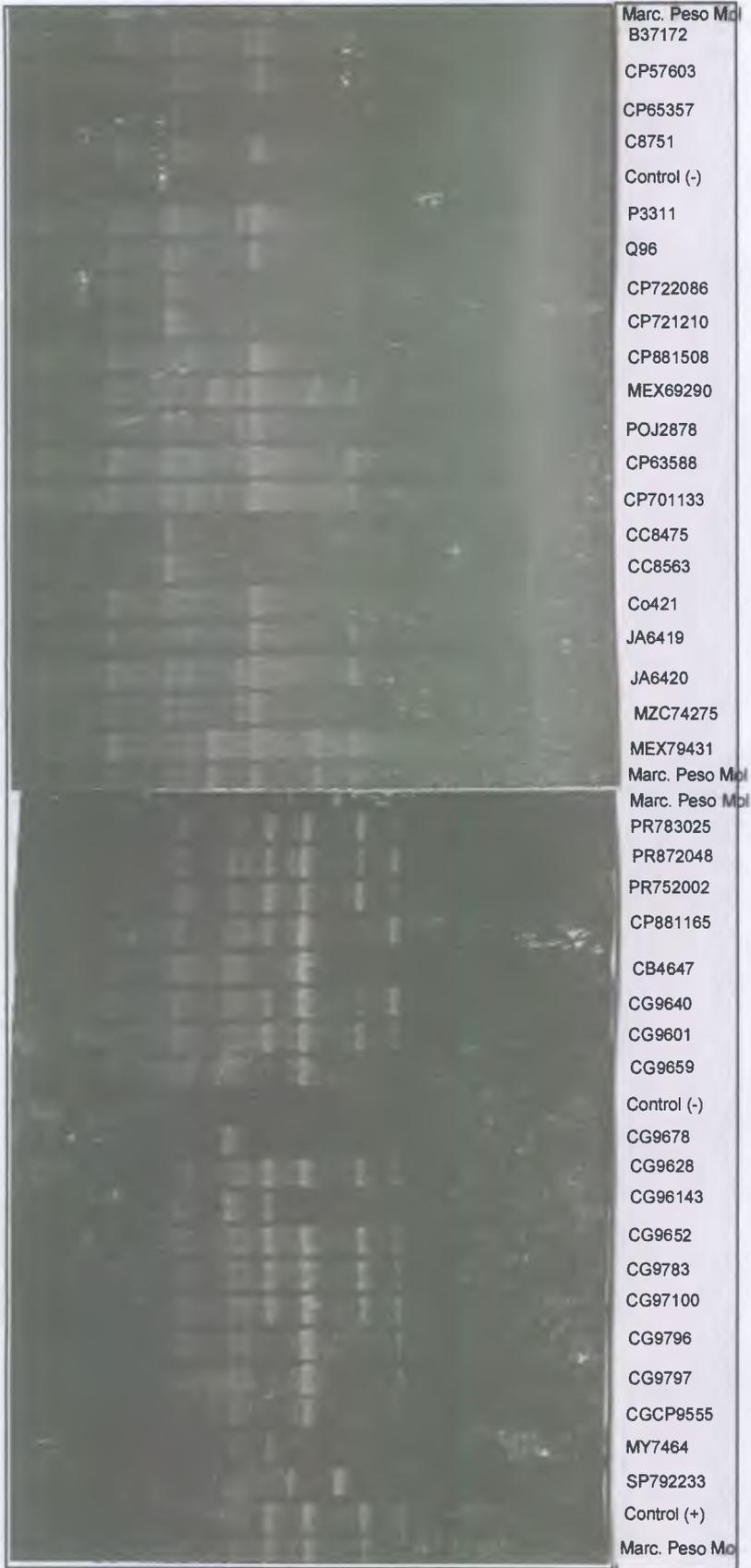
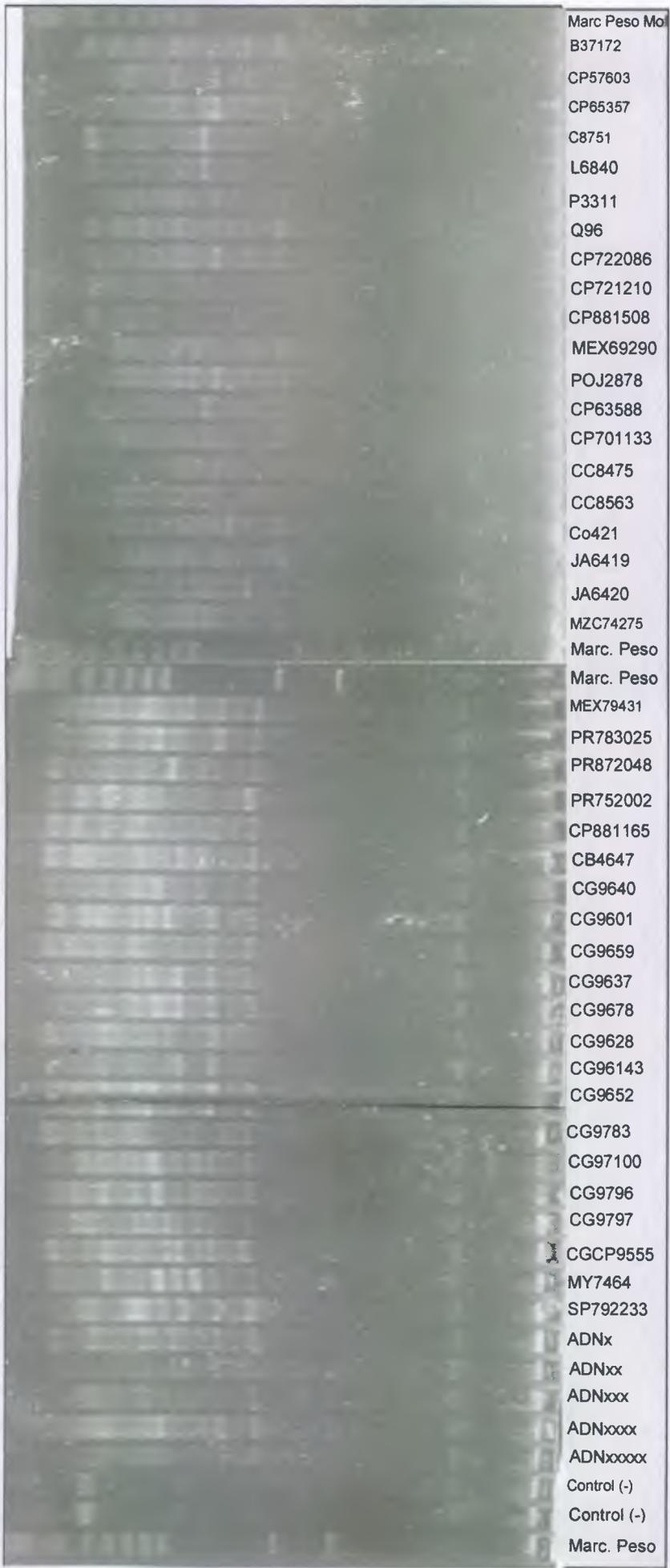


Figura 11. Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICANA utilizando el iniciador de Operon AA10 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's

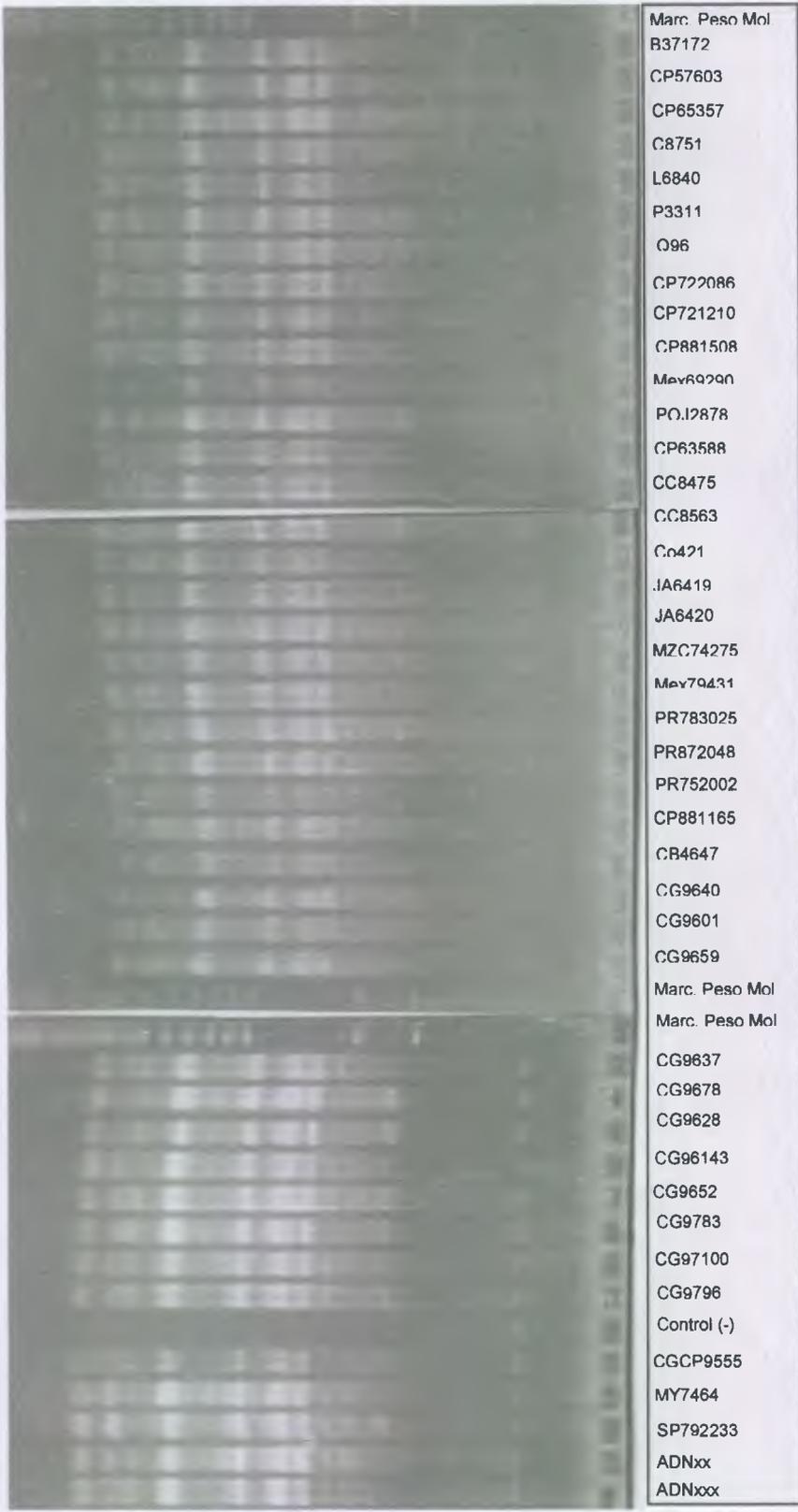
□



Marc. Peso Mo  
 B37172  
 CP57603  
 CP65357  
 C8751  
 L6840  
 P3311  
 Q96  
 CP722086  
 CP721210  
 CP881508  
 MEX69290  
 POJ2878  
 CP63588  
 CP701133  
 CC8475  
 CC8563  
 Co421  
 JA6419  
 JA6420  
 MZC74275  
 Marc. Peso  
 Marc. Peso  
 MEX79431  
 PR783025  
 PR872048  
 PR752002  
 CP881165  
 CB4647  
 CG9640  
 CG9601  
 CG9659  
 CG9637  
 CG9678  
 CG9628  
 CG96143  
 CG9652  
 CG9783  
 CG97100  
 CG9796  
 CG9797  
 CGCP9555  
 MY7464  
 SP792233  
 ADNx  
 ADNxx  
 ADNxxx  
 ADNxxxx  
 ADNxxxxx  
 Control (-)  
 Control (-)  
 Marc. Peso

Figura 12. Patrones de electroforésis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICANA utilizando el iniciador de Operon A04 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE GUATEMALA  
 Biblioteca



Marc. Peso Mol  
 B37172  
 CP57603  
 CP65357  
 C8751  
 L6840  
 P3311  
 Q96  
 CP722086  
 CP721210  
 CP881508  
 MevR9290  
 PO.12878  
 CP63588  
 CC8475  
 CC8563  
 Co421  
 JA6419  
 JA6420  
 MZC74275  
 Mev79431  
 PR783025  
 PR872048  
 PR752002  
 CP881165  
 CB4647  
 CG9640  
 CG9601  
 CG9659  
 Marc. Peso Mol  
 Marc. Peso Mol  
 CG9637  
 CG9678  
 CG9628  
 CG96143  
 CG9652  
 CG9783  
 CG97100  
 CG9796  
 Control (-)  
 CGCP9555  
 MY7464  
 SP792233  
 ADNxx  
 ADNxxx

Figura 13. Patrones de electroforesis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICANA utilizando el iniciador de Operon A01 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's



Marc Peso Mol  
 B37172  
 CP57603  
 CP65357  
 C8751  
 L6840  
 P3311  
 Q96  
 CP722086  
 CP721210  
 CP881508  
 MEX69290  
 POJ2878  
 CP63588  
 CP701133  
 CC8475  
 CC8563  
 Co421  
 JA6419  
 JA6420  
 MZC74275  
 MEX79431  
 PR783025  
 PR872048  
 PR752002  
 CP881165  
 CB4647  
 CG9640  
 CG9601  
 Marc Peso Mol  
 Marc Peso Mol  
 CG9659  
 CG9637  
 CG9678  
 CG9628  
 CG96143  
 CG9652  
 CG9783  
 CG97100  
 CG9796  
 CG9797  
 CGCP9555  
 MY7464  
 SP792233  
 Control (+)  
 Control (+)  
 Control (-)  
 Control (+)  
 Control (+)  
 Control (-)  
 Control (-)  
 Marc Peso Mol

Figura 14. Patrones de electroforesis obtenidos mediante el análisis de 41 variedades procedentes de la colección de trabajo de CENGICANA utilizando el iniciador de Operon D2 y la técnica de marcadores moleculares RAPD's □

***Matriz de presencia-ausencia generada mediante el análisis de 41 variedades de caña de azúcar (Saccharum spp) con los 10 iniciadores de Operon.***

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central















***Coeficiente de Dice obtenido mediante el análisis de 41 variedades de caña de azúcar (Saccharum spp). Generado con las matrices de presencia-ausencia de los 10 cebadores de Operon, Utilizando el programa NTSYS 2.1, CENGICAÑA 2004.***

|          | SP792233 | MY7464 | CGCP9555 | CG9797 | CG9796 | CG97100 | CG9783 | CG9652 | CG96143 | CG9628 | CG9676 | CG9637 | CG9659 | CG9601 | CG9640 | CB4647 | CP881165 | PR752002 | PR872048 | PR783025 | Mex79431 | MZC74275 | JA6420 | JA6419 | Co421 | CC8563 | CC8475 | CP701133 | CP63588 | POJ2878 | MEX69290 | CP881508 | CP721210 | CP722086 | Q96  | P3311 | L6840 | C8751 | CP65357 | CP57603 | B37172 |  |  |  |  |  |  |
|----------|----------|--------|----------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|--------|-------|--------|--------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|------|-------|-------|-------|---------|---------|--------|--|--|--|--|--|--|
| SP792233 | 1.00     |        |          |        |        |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| MY7464   | 0.66     | 1.00   |          |        |        |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CGCP9555 | 0.57     | 0.60   | 1.00     |        |        |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9797   | 0.46     | 0.42   | 0.63     | 1.00   |        |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9796   | 0.61     | 0.59   | 0.65     | 0.58   | 1.00   |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG97100  | 0.56     | 0.60   | 0.54     | 0.49   | 0.67   | 1.00    |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9783   | 0.49     | 0.51   | 0.44     | 0.46   | 0.61   | 0.63    | 1.00   |        |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9652   | 0.55     | 0.44   | 0.48     | 0.53   | 0.60   | 0.69    | 0.61   | 1.00   |         |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG96143  | 0.51     | 0.52   | 0.46     | 0.44   | 0.54   | 0.55    | 0.50   | 0.71   | 1.00    |        |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9628   | 0.37     | 0.35   | 0.46     | 0.52   | 0.46   | 0.45    | 0.46   | 0.62   | 0.60    | 1.00   |        |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9676   | 0.43     | 0.40   | 0.40     | 0.41   | 0.49   | 0.47    | 0.44   | 0.56   | 0.60    | 0.51   | 1.00   |        |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9637   | 0.41     | 0.45   | 0.36     | 0.42   | 0.42   | 0.42    | 0.39   | 0.52   | 0.57    | 0.45   | 0.66   | 1.00   |        |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9659   | 0.39     | 0.34   | 0.40     | 0.44   | 0.43   | 0.39    | 0.38   | 0.52   | 0.46    | 0.47   | 0.48   | 0.56   | 1.00   |        |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9601   | 0.38     | 0.35   | 0.37     | 0.31   | 0.42   | 0.42    | 0.43   | 0.48   | 0.44    | 0.37   | 0.39   | 0.36   | 0.37   | 1.00   |        |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CG9640   | 0.28     | 0.25   | 0.28     | 0.30   | 0.31   | 0.31    | 0.36   | 0.37   | 0.30    | 0.30   | 0.31   | 0.35   | 0.39   | 0.54   | 1.00   |        |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CB4647   | 0.34     | 0.33   | 0.33     | 0.32   | 0.41   | 0.36    | 0.38   | 0.42   | 0.38    | 0.32   | 0.39   | 0.40   | 0.36   | 0.59   | 0.70   | 1.00   |          |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP881165 | 0.34     | 0.33   | 0.31     | 0.31   | 0.39   | 0.41    | 0.41   | 0.45   | 0.41    | 0.31   | 0.35   | 0.36   | 0.38   | 0.61   | 0.68   | 0.72   | 1.00     |          |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| PR752002 | 0.34     | 0.29   | 0.28     | 0.24   | 0.28   | 0.32    | 0.33   | 0.41   | 0.36    | 0.24   | 0.29   | 0.31   | 0.36   | 0.61   | 0.60   | 0.61   | 0.62     | 1.00     |          |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| PR872048 | 0.31     | 0.35   | 0.33     | 0.33   | 0.32   | 0.34    | 0.36   | 0.44   | 0.36    | 0.30   | 0.32   | 0.31   | 0.29   | 0.57   | 0.64   | 0.65   | 0.63     | 0.67     | 1.00     |          |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| PR783025 | 0.38     | 0.37   | 0.32     | 0.29   | 0.32   | 0.38    | 0.40   | 0.42   | 0.32    | 0.26   | 0.37   | 0.36   | 0.32   | 0.57   | 0.63   | 0.61   | 0.62     | 0.59     | 0.72     | 1.00     |          |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| Mex79431 | 0.44     | 0.34   | 0.29     | 0.34   | 0.42   | 0.37    | 0.40   | 0.45   | 0.38    | 0.29   | 0.33   | 0.37   | 0.32   | 0.54   | 0.50   | 0.61   | 0.53     | 0.57     | 0.66     | 0.62     | 1.00     |          |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| MZC74275 | 0.34     | 0.30   | 0.23     | 0.26   | 0.31   | 0.31    | 0.30   | 0.34   | 0.25    | 0.17   | 0.35   | 0.36   | 0.31   | 0.47   | 0.50   | 0.53   | 0.47     | 0.53     | 0.57     | 0.61     | 0.59     | 1.00     |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| JA6420   | 0.34     | 0.29   | 0.25     | 0.25   | 0.34   | 0.34    | 0.32   | 0.36   | 0.31    | 0.22   | 0.31   | 0.36   | 0.26   | 0.44   | 0.49   | 0.56   | 0.45     | 0.52     | 0.57     | 0.58     | 0.60     | 0.68     | 1.00   |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| JA6419   | 0.34     | 0.34   | 0.27     | 0.29   | 0.39   | 0.29    | 0.35   | 0.40   | 0.35    | 0.24   | 0.34   | 0.38   | 0.28   | 0.46   | 0.43   | 0.54   | 0.51     | 0.46     | 0.51     | 0.54     | 0.55     | 0.62     | 0.64   | 1.00   |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| Co421    | 0.38     | 0.38   | 0.32     | 0.36   | 0.43   | 0.36    | 0.35   | 0.35   | 0.31    | 0.26   | 0.37   | 0.36   | 0.31   | 0.39   | 0.41   | 0.50   | 0.43     | 0.38     | 0.45     | 0.52     | 0.50     | 0.63     | 0.62   | 0.62   | 1.00  |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CC8563   | 0.35     | 0.33   | 0.29     | 0.31   | 0.38   | 0.31    | 0.30   | 0.38   | 0.27    | 0.21   | 0.35   | 0.30   | 0.27   | 0.45   | 0.41   | 0.50   | 0.43     | 0.45     | 0.49     | 0.47     | 0.51     | 0.61     | 0.54   | 0.63   | 0.66  | 1.00   |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CC8475   | 0.39     | 0.34   | 0.37     | 0.31   | 0.38   | 0.33    | 0.34   | 0.42   | 0.34    | 0.22   | 0.32   | 0.36   | 0.26   | 0.42   | 0.44   | 0.50   | 0.46     | 0.38     | 0.52     | 0.54     | 0.51     | 0.55     | 0.57   | 0.58   | 0.58  | 0.66   | 1.00   |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP701133 | 0.34     | 0.32   | 0.41     | 0.34   | 0.37   | 0.39    | 0.35   | 0.41   | 0.39    | 0.34   | 0.30   | 0.27   | 0.32   | 0.39   | 0.35   | 0.34   | 0.36     | 0.37     | 0.41     | 0.42     | 0.41     | 0.39     | 0.47   | 0.48   | 0.46  | 0.44   | 0.52   | 1.00     |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP63588  | 0.29     | 0.26   | 0.29     | 0.26   | 0.32   | 0.29    | 0.24   | 0.33   | 0.35    | 0.28   | 0.29   | 0.32   | 0.28   | 0.29   | 0.38   | 0.32   | 0.33     | 0.34     | 0.36     | 0.38     | 0.34     | 0.48     | 0.48   | 0.48   | 0.51  | 0.50   | 0.52   | 0.70     | 1.00    |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| POJ2878  | 0.38     | 0.35   | 0.29     | 0.29   | 0.35   | 0.32    | 0.26   | 0.38   | 0.38    | 0.29   | 0.31   | 0.35   | 0.33   | 0.37   | 0.27   | 0.34   | 0.33     | 0.30     | 0.32     | 0.34     | 0.42     | 0.38     | 0.38   | 0.46   | 0.46  | 0.49   | 0.48   | 0.57     | 0.59    | 1.00    |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| MEX69290 | 0.31     | 0.26   | 0.28     | 0.26   | 0.26   | 0.28    | 0.27   | 0.29   | 0.30    | 0.25   | 0.28   | 0.35   | 0.36   | 0.35   | 0.43   | 0.37   | 0.38     | 0.35     | 0.35     | 0.41     | 0.38     | 0.44     | 0.47   | 0.43   | 0.42  | 0.45   | 0.54   | 0.54     | 0.58    | 0.61    | 1.00     |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP881508 | 0.35     | 0.29   | 0.35     | 0.23   | 0.31   | 0.29    | 0.25   | 0.29   | 0.34    | 0.21   | 0.31   | 0.33   | 0.24   | 0.38   | 0.38   | 0.35   | 0.39     | 0.39     | 0.44     | 0.48     | 0.42     | 0.49     | 0.50   | 0.49   | 0.49  | 0.58   | 0.56   | 0.58     | 0.52    | 0.61    | 1.00     |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP721210 | 0.40     | 0.31   | 0.30     | 0.27   | 0.32   | 0.33    | 0.30   | 0.31   | 0.34    | 0.22   | 0.28   | 0.29   | 0.25   | 0.46   | 0.45   | 0.47   | 0.44     | 0.40     | 0.46     | 0.50     | 0.49     | 0.52     | 0.46   | 0.49   | 0.47  | 0.56   | 0.64   | 0.50     | 0.53    | 0.54    | 0.64     | 0.65     | 1.00     |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP722086 | 0.41     | 0.36   | 0.32     | 0.22   | 0.34   | 0.34    | 0.27   | 0.32   | 0.37    | 0.21   | 0.31   | 0.27   | 0.26   | 0.43   | 0.40   | 0.50   | 0.45     | 0.41     | 0.44     | 0.46     | 0.48     | 0.42     | 0.52   | 0.50   | 0.49  | 0.54   | 0.61   | 0.45     | 0.49    | 0.49    | 0.58     | 0.63     | 0.74     | 1.00     |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| Q96      | 0.41     | 0.34   | 0.33     | 0.25   | 0.37   | 0.35    | 0.31   | 0.25   | 0.35    | 0.24   | 0.35   | 0.30   | 0.22   | 0.44   | 0.41   | 0.47   | 0.39     | 0.38     | 0.39     | 0.43     | 0.45     | 0.46     | 0.54   | 0.44   | 0.51  | 0.51   | 0.60   | 0.48     | 0.55    | 0.53    | 0.56     | 0.61     | 0.64     | 0.65     | 1.00 |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| P3311    | 0.41     | 0.40   | 0.34     | 0.32   | 0.39   | 0.37    | 0.30   | 0.38   | 0.41    | 0.30   | 0.39   | 0.30   | 0.24   | 0.42   | 0.37   | 0.47   | 0.39     | 0.31     | 0.41     | 0.44     | 0.45     | 0.48     | 0.51   | 0.45   | 0.55  | 0.54   | 0.59   | 0.51     | 0.47    | 0.53    | 0.50     | 0.51     | 0.61     | 0.60     | 0.68 | 1.00  |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| L6840    | 0.45     | 0.38   | 0.40     | 0.38   | 0.36   | 0.35    | 0.31   | 0.42   | 0.42    | 0.31   | 0.38   | 0.37   | 0.32   | 0.40   | 0.41   | 0.49   | 0.36     | 0.42     | 0.40     | 0.42     | 0.45     | 0.54     | 0.45   | 0.42   | 0.49  | 0.55   | 0.60   | 0.51     | 0.49    | 0.49    | 0.51     | 0.49     | 0.67     | 0.61     | 0.61 | 0.60  | 1.00  |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| C8751    | 0.42     | 0.41   | 0.43     | 0.38   | 0.39   | 0.38    | 0.38   | 0.41   | 0.39    | 0.29   | 0.40   | 0.41   | 0.34   | 0.45   | 0.43   | 0.51   | 0.43     | 0.36     | 0.47     | 0.55     | 0.52     | 0.58     | 0.50   | 0.52   | 0.59  | 0.60   | 0.62   | 0.54     | 0.53    | 0.58    | 0.53     | 0.56     | 0.60     | 0.58     | 0.63 | 0.64  | 0.69  | 1.00  |         |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP65357  | 0.39     | 0.40   | 0.38     | 0.37   | 0.42   | 0.39    | 0.34   | 0.41   | 0.39    | 0.33   | 0.41   | 0.40   | 0.30   | 0.41   | 0.37   | 0.47   | 0.41     | 0.31     | 0.42     | 0.48     | 0.46     | 0.54     | 0.53   | 0.51   | 0.59  | 0.54   | 0.61   | 0.54     | 0.48    | 0.48    | 0.47     | 0.48     | 0.60     | 0.60     | 0.61 | 0.73  | 0.73  | 0.69  | 1.00    |         |        |  |  |  |  |  |  |
| CP57603  | 0.43     | 0.34   | 0.36     | 0.23   | 0.36   | 0.35    | 0.28   | 0.40   | 0.39    | 0.26   | 0.41   | 0.39   | 0.34   | 0.44   | 0.41   | 0.50   | 0.42     | 0.36     | 0.41     | 0.46     | 0.45     | 0.5      |        |        |       |        |        |          |         |         |          |          |          |          |      |       |       |       |         |         |        |  |  |  |  |  |  |

*Dendrograma de relaciones genéticas de 41 variedades de caña de azúcar generado mediante el análisis de las matrices de presencia-ausencia obtenidas de la amplificación de fragmentos RAPD's con 10 cebadores de Operon utilizando el programa UPGMA, del paquete NTSYS 2.1. CENGICAÑA.*

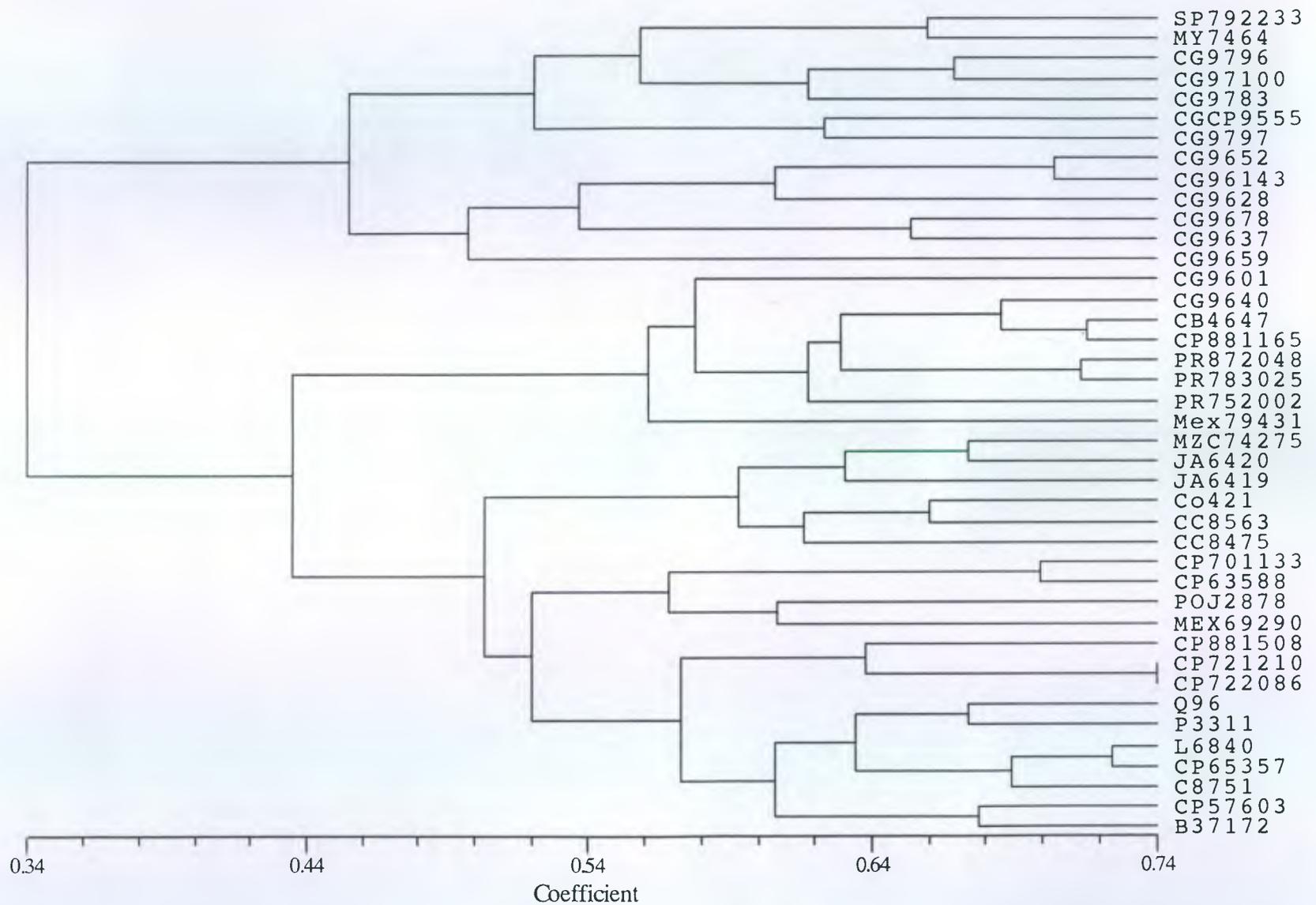


Figura 15. Dendrograma de relaciones genéticas de 41 variedades de caña de azúcar generado mediante el análisis de las matrices de presencia-ausencia obtenidas de la amplificación de fragmentos RAPD's con 10 cebadores de Operon " utilizando el programa UPGMA, del paquete NTSYS 2.1. CENGICAÑA.



REF. Sem. 19/2005

LA TESIS TITULADA:

"USO DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN POLIMORFICOS AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD'S) PARA SELECCIONAR PROGENITORES EN CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum spp*)"

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE :

EDGAR IVAN AGUIRRE SOLIS

CARNE:

9619969

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES :

Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamontes  
 Dr. César Augusto Azurdia Pérez  
 Dr. Carlos Alfonso Orozco Castillo  
 Ing. Agr. Marco Vinicio Fernández Montoya

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. Domingo Amador Pérez  
 ASESOR

FACULTAD DE AGRONOMIA  
 -USAC-

RECIBIDO  
 04 JUL. 2005

UNIDAD DE CONTROL ACADÉMICO  
 HORA 16:20 FIRMA

FACULTAD DE AGRONOMIA  
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS  
 DIRECCION  
 DE SAN CARLOS  
 Dr. David Monterroso Salvatierra  
 DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMASE

Dr. Ariel Abderramán Ortiz López  
 DECANO



DMS/nm  
 c.c. Archivo  
 IIA  
 Control Académico

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
 Biblioteca Central