

Mapa de ligamiento de variedades cubanas de caña de azúcar mediante marcadores RFLP

E. Canales^(1,2), M. T. Cornide^(1,3) y O. Coto^(1,4)

(1): Depto. de Bioplantas. CNIC

(2): Dirección actual: División Agropecuaria, CIGB

(3): Dirección actual: INICA

(4): Dirección actual: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

e-mail: eduardo.canales@cigb.edu.cu

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar se encuentra entre las especies vegetales genéticamente más complejas, para las cuales se ha emprendido el mapeo genético. La caña de azúcar (*Saccharum spp.*) así como las especies silvestres cercanas, son poliploides con un genoma relativamente grande. Las variedades comerciales son a menudo aneuploides, producto de hibridaciones interespecíficas. Debido a estas características, el mapeo con marcadores no puede ser aplicado a la caña como a las especies diploides. Un nuevo enfoque para el mapeo en poliploides ha sido desarrollado por Wu y col. (1992), basado en el uso de marcadores en dosis simple, los cuales están presentes en un padre y ausentes en el otro y segregan 1:1 en la progenie.

El empleo de los marcadores del polimorfismo del ADN o marcadores moleculares ha posibilitado impulsar notablemente el conocimiento genómico, la localización de loci asociados a caracteres cuantitativos (QTLs) de interés para el mejoramiento y las aplicaciones de estas investigaciones en la identificación y manejo de germoplasma. Se espera que a mediano plazo constituya un instrumento obligado para la selección de nuevas variedades y para la introducción eficiente de nuevos genes provenientes de otras formas del complejo *Saccharum*.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un mapa de ligamiento basado en marcadores RFLP en dosis simple para el cruce de dos variedades cubanas: C 323-68 x Ja 60-5.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se estudió la progenie comercial C 323-68 x Ja 60-5 compuesta por 105 individuos obtenidos mediante cruzamiento experimental en las instalaciones del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar.

Análisis de RFLP

El ADN genómico total se extrajo a partir de hojas liofilizadas y congeladas según Hoisington (1992). El ADN (10 µg) fue digerido con las enzimas de restricción según indicaciones del proveedor (Amersham). Los restringidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 0.8% en solución tampón TAE 1X y se transfirieron a membranas de nylon (Hybond N+ Amersham) mediante NaOH (0.4N). Las sondas fueron marcadas con ³²P-dATP utilizando el kit de marcaje de cebadores al azar (Amersham). Las hibridaciones se efectuaron según Hoisington (1992).

Para la elección de las sondas a emplear en el mapeo se estudió el polimorfismo entre los padres mediante sondas heterólogas de maíz: UMC, BNL, PIC y CSU y 45 sondas de caña de azúcar: SSCIR y PLT, en combinación con 8 enzimas de restricción: EcoR I, EcoR V, Hind III, BamH I, Dra I, Pst I, Xho I y Xba I.

Para el análisis de la progenie se escogieron las combinaciones enzima-sonda de mayor polimorfismo y facilidad de lectura de los patrones, estas correspondieron a 46 sondas representativas del 39% del polimorfismo reportado en el mapa de Grivet y col. (1996).

Procesamiento estadístico

Mapeo de marcadores

Se analizaron los patrones de segregación de la progenie estudiada para la totalidad de las combinaciones enzima-sondas (RFLPs) polimórficas entre los padres. Estas fueron evaluadas de forma binaria considerando 0 como ausencia y 1 como presencia. Para la determinación de los loci en dosis simple (SDRFs), las proporciones de segregación fueron probadas para las desviaciones de la proporción esperada 1:1 empleando la prueba de X^2 para $P < 0.05$ y 1 grado de libertad (Wu y col. 1992).

Para la determinación del dosaje de los fragmentos en dosis múltiples se consideraron las proporciones siguientes (Grivet, 1995; Cornide y Sánchez, 1997):

DDRF $\geq 3:1 \leq 4:1$ (alo y auto $h=8$ y auto $h=10$)

TDRF $\geq 7:1 \leq 15:1$ (alo y auto $h=8$ y auto $h=10$)

CDRF $\geq 69:1$

Los SDRFs fueron empleados para el análisis de ligamiento efectuado mediante el programa MAPMAKER (Lander y col., 1987), por análisis de dos puntos con LOD scores de 3, para un máximo de recombinación de 0.50. Las distancias se transformaron a centiMorgans (cM) empleando la función de Haldane (Lander y col., 1987). Para determinar el ligamiento en fase de repulsión se empleó la metodología de Al-Janabi y col. (1993). Con este fin, el juego de datos originales de los SDRFs fue copiado invirtiendo los valores de cada polimorfismo. El fichero resultante de la unión de ambos, fue procesado nuevamente con el MAPMAKER mediante análisis de dos puntos. Se procedió a identificar los ligamientos en fase de repulsión por la aparición de ligamiento entre fragmentos de ambos ficheros.

Los grupos de cosegregación con SDRFs múltiples de sondas comunes fueron clasificados en posibles grupos de homología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Polimorfismo revelado

Se mantuvo la calidad de la prueba del polimorfismo entre los padres obteniéndose en todos los casos segregación en la progenie de los fragmentos polimórficos y un alto grado de heterocigosidad para los loci polimórficos en ambos padres (Tabla 1).

La identificación de fragmentos SDRFs y MDRFs en las condiciones del presente trabajo es confiable ya que se requieren según Wu y col. (1992) sólo 75 individuos para diferenciar 1:1 vs $\geq 3:1$, ($P < 0.05$ y $\alpha_1 = \alpha_2 = 0.01$) en auto y aloploidos.

La identificación de fragmentos SDRFs, DDRFs y TDRFs, sucesivamente entre sí, dado el tamaño de la progenie estudiada ($n=105$) es también confiable para un auto-octoploide, puesto que aplicando la fórmula recomendada por dichos autores se requieren 27 (1:1 vs. 3.7:1), 60 (3.7:1 vs. 13.1:1) y 117 (13.1 vs. 69:1) individuos, respectivamente ($P < 0.05$ y $\alpha_1 = \alpha_2 = 0.01$).

Los 112 SDRFs identificados provienen: 58 de la C 323-68 y 54 de la Ja 60-5 (Tabla 1). Nótese que el 35% de los SDRFs detectados (39 SDRFs) fueron fragmentos múltiples, revelados por 15 sondas de alto polimorfismo. Los fragmentos en dosis múltiples fueron revelados por 18 sondas y su dosaje fue el siguiente: 18 DDRFs (7 de C323-68 y 11 de Ja 60-5), 7 TDRFs (6 de C323-68 y 1 de Ja 60-5) y 1 CDRF (Ja 60-5).

Determinación del tipo y nivel de ploidía

El 72.6% de los loci segregantes fueron de dosis simples lo cual se ajusta a la proporción esperada ($\chi^2_{1, 0.01} 0.412$ NS) para los auto-octoploides y permite descartar la aloploidía ($\chi^2_{1, 0.01} 9.639$ **) en la parte del genoma analizado de dichas variedades. Este resultado confirma el reportado de 73.1% para *Saccharum spontaneum* por Da Silva y col. (1993) y de 80% para la variedad R570, por Grivet y col. (1996).

Tabla 1. Polimorfismo RFLP en la progenie.

Sonda	Grupo de ligamiento (*)	Enzima	Bandas totales	Bandas polimórficas	SDRF	SDRF ligados
BNL16.06	X	Hind III	13	6	5	5
CSU20	1	EcoR V	6	3	2	-
CSU37		Hind III	2	1	1	1
CSU81		EcoR V	8	5	4	2
CSU92		Dra I	2	2	1	-
CSU102		Dra I	1.0	4	2	-
CSU142	8	EcoR I	11	4	3	-
PIC11	5	EcoR V	9	4	3	-
PIC12	1	EcoR V	9	4	4	1
PIC13	1,3,6,7	EcoR I	16	6	6	4
PIC17	2	EcoR V	6	3	3	1
PLT	-	EcoR V	7	5	5	3
SSCIR60	III	Hind III	7	2	1	1
SSCIR69	I	Hind III	15	2	2	2
SSCIR73	I	Hind III	13	2	2	2
SSCIR74	V	EcoR V	5	1	-	-
SSCIR76	IX	EcoR I	6	2	2	-
SSCIR77	IV	EcoR I	1	1	-	-
SSCIR78	III	EcoR I	11	4	2	1
SSCIR79	II	Hind III	5	1	1	-
SSCIR79	II	EcoR V	10	3	3	2
SSCIR83	X	Hind III	9	4	3	3
SSCIR88	U	EcoR I	6	3	3	2
SSCIR91	X	Dra I	6	2	1	1
SSCIR92	VIII	EcoR V	1	1	1	-
SSCIR103	II,X	Hind III	8	3	2	1
SSCIR107	VIII	EcoR I	3	1	-	-
SSCIR120	U	Hind III	6	3	3	1
SSCIR166	X	EcoR I	5	1	1	1
SSCIR172	II	EcoR I	7	3	3	-
SSCIR190	X	Hind III	9	5	3	2
SSCIR194	VIII	EcoR I	10	5	2 (1)	-
SSCIR194	VII	EcoR V	10	7	5	2
SSCIR215	U	Dra I	10	4	3	1
SSCIR217	V	EcoR I	10	3	3	2
SSCIR232	II	EcoR I	5	3	3	2
SSCIR251	II	Hind III	5	2	1	1
SSCIR256	VI	Hind III	4	1	1	-
SSCIR257	X	Hind III	12	5	4	4
UMC4	X	Dra I	7	4	2	2
UMC10	II, III	Hind III	4	2	2	1
UMC16	II	Dra I	7	3	2	2
UMC36	X	Hind III	6	3	2	2
UMC39	II	Hind III	8	4	3	2
UMC44	VIII	EcoR I	3	2	2	1
UMC81	IX	Dra I	13	6	1	-
UMC113	IX	Hind III	8	6	2	-
UMC114	IX	EcoR I	3	3	3	-
Ja 60-5			277	78	54	27
C323-68			275	76	58	32
48			337	154	112 (72.7%)	59

(*) I-X: grupos de ligamiento (Grivet y col., 1996)

1-10: cromosomas del maíz (Davis y col., 1999)

No obstante esto, las proporciones SDRF:MDRF observadas no permiten rechazar las proporciones teóricas esperadas en caso de autodecaploidía (2.03:1), a la que también se ajustan para $P < 0.01$.

Análisis de ligamiento

El número relativamente alto de SDRFs polimórficos detectados por cada sonda (2.4) permitió la determinación de 20 grupos de ligamiento o cosegregación (Fig. 1) de 59 SDRFs revelados por 32 sondas. Un grupo de 53 fragmentos SDRFs no mostraron asociación con los anteriores (Tabla 1).

De los 20 grupos de cosegregación (9 Ja 60 5 y 11 C 323-68), 16 conformaron 4 grupos de homología (A-D). Los SDRF determinados representan a la totalidad de los grupos de ligamiento reportados por Grivet y col. (1996) con excepción del IV y más de 5 cromosomas del maíz según Collins y col. (1998).

Los grupos de cosegregación reportados se unieron sobre la base de la presencia de marcadores revelados por sondas comunes. Estas relaciones de homología aparecen esquematizadas en la Fig. 2 en la que se observan los fragmentos múltiples revelados por 15 sondas que permitieron confirmar los cuatro grupos de homología (A-D) reportados.

El ordenamiento de los marcadores es coincidente con los segmentos de los grupos de ligamiento reportados para la variedad R570 por Grivet y col. (1996):

Grupos de cosegregación	Grupo de homología	Grupos de ligamiento	
		Caña ⁽¹⁾	Sorgo ⁽²⁾
1 y 2	A	I	C1
3-6	B	II-III	G
7	-	II-III	G
8	-	V	C2
9, 10-13, 14 y 15	C	X	F
16, 17 y 18	D	U	A
19	-	VIII	B
20	-	VII	D

⁽¹⁾: Grivet y col., 1996

⁽²⁾: Pereira y col., 1994; Boivin y col., 1999

Tabla 2. Dosaje (múltiple) de los marcadores segregantes en la progenie.

Combinación	DDRF			Total DDRF	TDRF			Total TDRF	CDRF 69:1	Total MDRF
	3:1	3.7:1	4:1		7:1	13:1	15:1			
BNL16.06	1			1						1
CSU81		1	1	1						1
CSU92	1	1	1	1						1
CSU102	2	2	1	2						2
SSCIR60	1	1	1	1						1
SSCIR77	1			1						1
SSCIR78	1	2	2	2						2
SSCIR83		1	1	1						1
SSCIR91	1	1		1						1
SSCIR190	1	1	1	1						1
SSCIR194					1	2	2	2	1	3
SSCIR194					1	2	1	2		2
SSCIR257	1	1	1	1						1
UMC4					1	1	1	1		1
UMC16	1	1		1						1
UMC39						1	1	1		1
UMC81	3	3	3	3	1	1	1	1		4
UMC113	1	1	1	1						1
Ja 60-5				11				1	1	13
C 323-68				7				6		13
	15	16	13	18	7	7	6	7	1	26

El diseño genético del presente estudio, basado en SDRFs polimórficos en una progenie tipo retrocruce, quedó evidenciado por el ligamiento de los marcadores según su origen paterno en: 9 grupos de Ja 60-5 y 11 grupos de C 323-68.

Se localizaron pares de marcadores con las distancias siguientes:

4 pares con distancias <3 cM, de estos 2 en repulsión;

9 pares con distancias entre 4 cM y 10 cM, de estos 5 en repulsión;

13 pares con distancias entre 10 cM y 25 cM, de estos 5 en repulsión.

Los estimados de distancia son preliminares dado el estado de saturación de este mapa y las características de la planta en que la densidad varía notablemente con las regiones en dependencia no sólo del grado de parentesco entre los progenitores sino de la contribución relativa de los ancestros *Saccharum officinarum* y *S. spontaneum* a sus respectivos genomas (Grivet, 1995; Grivet y Arruda, 2001).

En el grupo de homología C, las relaciones de ligamiento determinadas están en correspondencia con el grupo X de Grivet y col. (1996).

Es notable el polimorfismo expresado por la presencia de SDRFs múltiples de ambos progenitores de las sondas SSCIR83, 190 y 257, de UMC4 y 36 y BNL16.06 los que permitieron conformar este grupo de homología.

El marcador CSU81 ubicado en el grupo de ligamiento 11 (grupo de homología C), que se corresponde con el grupo de ligamiento X de Grivet y col. (1996), se encuentra mapeado en el grupo de homología 4 de *S. officinarum* y *S. spontaneum* (Ming y col., 2002). La sonda UMC4 que pertenece a los grupos de ligamiento 12 y 13 (grupo de homología C), así como la sonda SG298 (no utilizada en este trabajo) están mapeadas en el grupo X de Grivet y col. (1996) y en el grupo 4 de Ming y col. (2002), lo cual corrobora el ligamiento de estas sondas.

La verificación ulterior de su homología debe llevarse a cabo mediante la incorporación de un número mayor de SDRFs múltiples y mediante la comprobación de la independencia de ligamiento de los datos de segregación de los DDRFs en relación con los de SDRFs, y de los TDRFs en relación con los DDRFs, provenientes de sondas comunes, dentro de cada posible grupo de homología.

Conclusiones

- Se confirma que el polimorfismo genómico de las variedades estudiadas segrega según un modelo de autoploidie en ausencia de doble reducción, en concordancia con resultados previos en *Saccharum* spp.
- Se confirma la coincidencia genómica de las variedades cubanas estudiadas con segmentos mapeados en el mapa de referencia de la caña de azúcar de Grivet y col. (1996), en 7 grupos de ligamiento (I,II,III,V, VII, VIII, X).
- Se evidencia un alto polimorfismo para los loci marcadores del grupo X de ligamiento (Grivet y col., 1996), entre los progenitores C 323-68 y Ja 60-5, expresado por la presencia de SDRFs múltiples entre los grupos de cosegregación compuestos por marcadores de ambos progenitores; lo cual permitió determinar su asociación con los cuatro componentes del rendimiento evaluados en estas variedades.

Referencias bibliográficas

- Al-Janabi, S. M., R. J. Honeycutt, M. McClelland, y B. W. S. Sobral. 1993. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L., "SES 208". *Genetics* 134: 1249-1260.
- Boivin K., M. Deu, J-F. Rami, G. Trouche y P. Hamon. 1999. Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 98: 320-328
- Collins N. C., C. A. Webb, S. Seah, J. G. Ellis, S. H. Hulbert y A. Pryor. 1998. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 10: 968-978.
- Cornide M.T. y J.E. Sánchez. 1997. Metodología genético-estadística para la determinación del dosaje de marcadores moleculares en poliploides. POLIMAP. *Reporte de Investigaciones. Centro de Matemática y Física Teórica. ICIMAF* (ISSN 0138-8916). Noviembre, 1997, 24pp.
- Da Silva, J. A. G., M. E. Sorrells, W. L. Burnquist y S. d. Tanksley. 1993. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome*, 36: 782-791.

- Grivet, L. 1995. Marquage moléculaire chez la canne à sucre (*Saccharum* spp.); décomposition d'une structure génétique complexe et application à l'amélioration variétale. Thèse présentée pour obtenir le Grade de Docteur en Sciences de l'Université de Paris XI Orsay. No. 3649. Soutenue le 4 Avril, 1995, 110 pp.
- Grivet, L., A. D'Hont, D. Roques, P. Feldmann, C. Lanaud y J. C. Glaszmann. 1996. RFLP Mapping in Cultivated Sugarcane (*Saccharum* spp.): Genome Organization in a Highly Polyploid and Aneuploid Interspecific Hybrid. *Genetics* 142: 987-1000.
- Grivet, L., Arruda, P. 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 122-127.
- Hoisington, D., 1992. *Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*, CIMMYT, Mexico, D.F.
- Lander, E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln y L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps in experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174-181.
- Ming, R., S-C. Liu, J.E. Bowers, P.H. Moore, J.E. Javine y A.H Paterson. 2002. Construction of a *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses. *Crop Sci.* 42: 570-583.
- Pereira, M. G., Lee, M., Bramel, C. P., Woodman, W., Doebley, J., Whitkus, R. 1994. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome*, 37: 236-243.
- Wu, K.K., W. Burnquist, M.E. Sorrells, T.L. Tew, P.H. Moore y S.D. Tanksley. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 294-300.

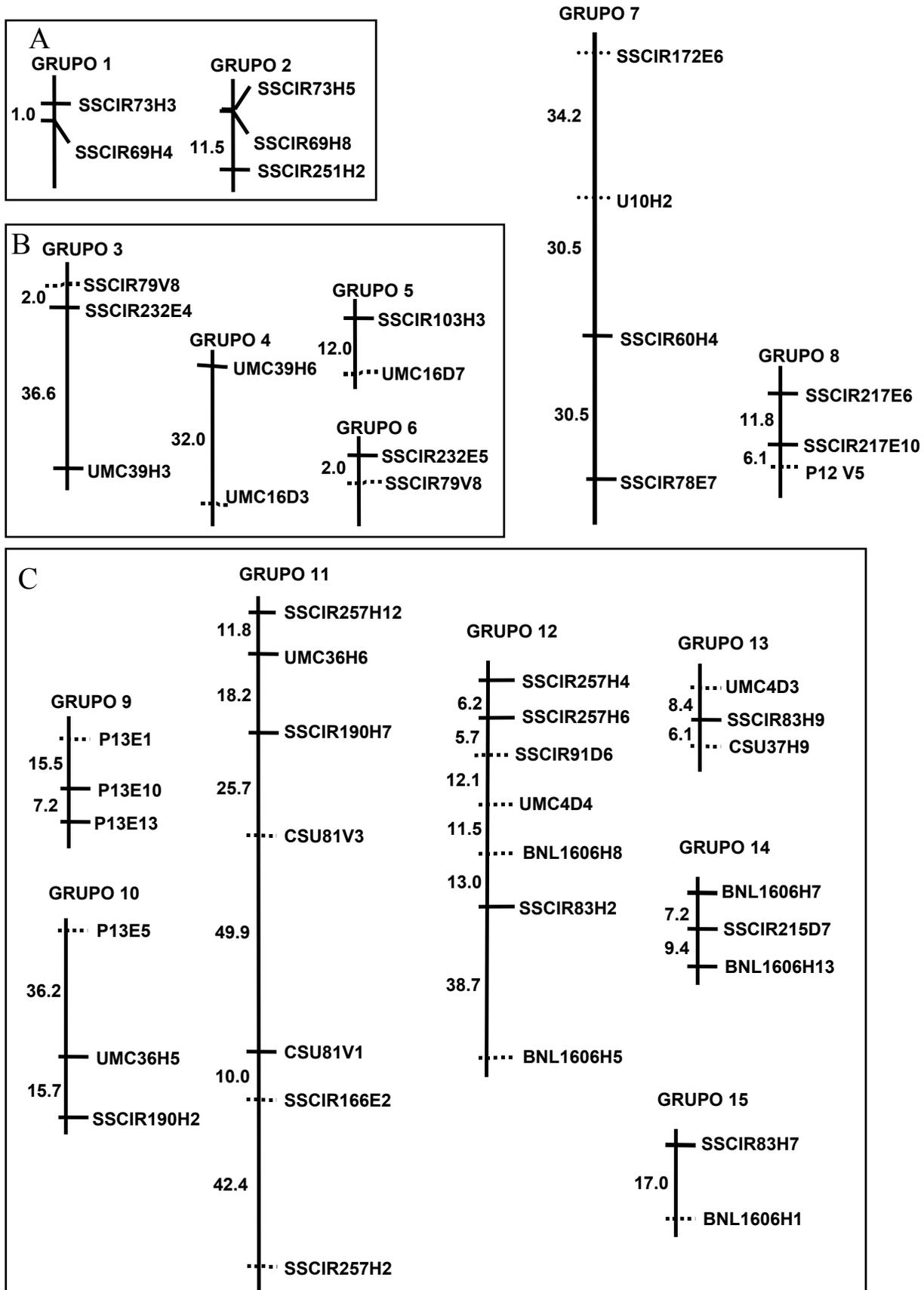


Fig. 1. Mapa genético de la progenie C 323-68 x Ja 60-5 mediante RFLP. Los datos de segregación permitieron unir 56 SDRFs, generados por 29 sondas, en 20 grupos de cosegregación. Números a la izquierda son las distancias en centiMorgans usando la función de Haldane. Los nombres de los loci aparecen a la derecha. Ligamientos en repulsión están representados por líneas discontinuas.

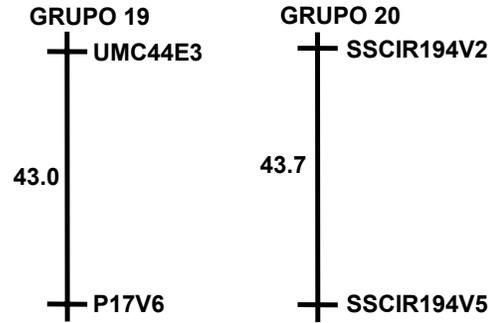
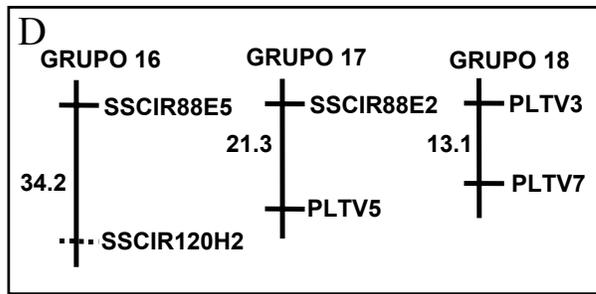
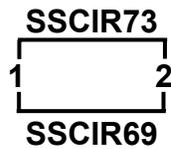
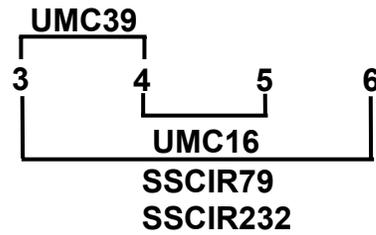


Fig.1. Continuación.

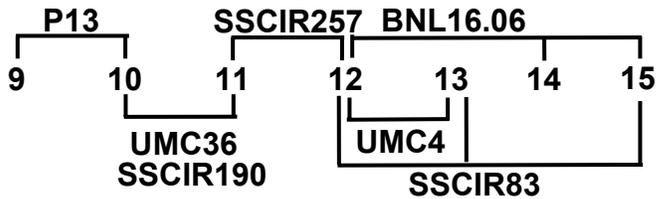
GRUPO HOMOLOGO A



GRUPO HOMOLOGO B



GRUPO HOMOLOGO C



GRUPO HOMOLOGO D

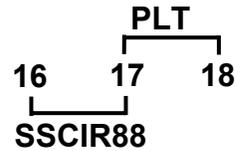


Fig. 2. Posible homología entre los grupos de cosegregación determinados en la progeie C32368 x Ja60-5.