

Utilidad de la técnica de RAPD de Alta Resolución para la caracterización molecular de dos genotipos emparentados de caña de azúcar (*Saccharum spp*)

Paola Fontana*, Gabriela García**, María Inés Cuenya***, Ernesto Chavanne***, Marta Ontivero****, Juan Díaz Ricci***** y Atilio P. Castagnaro*****

Introducción

La estructura genómica de los materiales fitotécnicos de caña de azúcar es muy compleja, debido a que los mismos provienen de hibridaciones interespecíficas e intergenéricas. Además estos materiales muestran una serie de fenómenos a nivel cromosómico como por ejemplo elevado grado de ploidía, anomalías meióticas, aneuploidía, mosaicismo cromosómico y otros. Tradicionalmente la caracterización del germoplasma en caña de azúcar se realizaba mediante evaluaciones fenotípicas, es decir en base a observaciones de caracteres exteriores visibles. Las determinaciones genéticas, basadas en el análisis de ADN resulta fundamental en situaciones en las que la diferenciación y/o identificación fenotípica se vuelve dificultosa. Los marcadores moleculares analizan directamente la información contenida en el ADN. Los más usados son: RFPL (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción), AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados) y RAPD (Polimorfismo de ADN Amplificado Arbitrariamente).

Los RAPDs fueron los primeros marcadores basados en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Entre sus características se pueden distinguir:

- relativamente fáciles de usar y económicos.
- rápidos de generar.
- carácter dominante (no se puede identificar individuos heterocigotas)
- confiables cuando la técnica esta bien optimizada.
- baja repetibilidad entre laboratorios.
- se requieren muy pequeñas cantidades de ADN, cuya secuencia no es necesario conocer previamente.

En caña de azúcar estos marcadores fueron

usados para detectar polimorfismos de manera rápida y reproducible (Oropeza and De Garcia, 1997). También se utilizaron para la determinación de la diversidad genética en 20 híbridos comerciales (Harvey and Botha, 1996) y entre miembros del complejo *Saccharum* para análisis taxonómico en grupos estrechamente relacionados (Harvey and Botha, 1996; Nair *et al.*, 1999).

Sin embargo la técnica de RAPD convencional no permite, en algunos casos, visualizar claramente polimorfismos entre genotipos, particularmente cuando se trata de individuos muy emparentados. En el presente trabajo se utilizó la técnica de RAPD, combinada con la alta resolución de la electroforesis en gel de poliacrilamida (García *et al.*, 2002), para diferenciar genéticamente un clon promisorio de caña de azúcar de su progenitor femenino.

Metodología utilizada

Material vegetal

En el análisis se incluyeron dos genotipos de la Unidad Integrada para el Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar (UIMCA, EEAOC-INTA), el clon RA 96-15 y la variedad comercial LCP 85-384, de reciente difusión en el área cañera de Tucumán y frecuentemente utilizada como progenitor en el programa de cruzamientos.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo siguiendo la metodología descrita por Aljanabi *et al.*, 1999. Se utilizó la porción más joven del meristema de brotes tiernos de aproximadamente 50 cm de altura. Este material fue congelado y molido con nitrógeno líquido. Para la extracción se empleó aproximadamente 100 mg. de material molido por cada muestra.

*Ing. Agr., *****Dr., Sección Biotecnología, **Ings. Agrs., Sección Caña de Azúcar, EEAOC
Ing. Agr., **Bqca., *****Dr., INSIBIO-UNT

La pureza y concentración del ADN se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7%, teñido con bromuro de etidio, comparando con un standard apropiado (ADN lambda Hind III). El gel se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Amplificación por RAPD:

Para la caracterización genotípica, se empleó la técnica de RAPD combinada con electroforesis en geles de poliacrilamida (García *et al.*, 2002). El ADN fue analizado con 15 cebadores de la Serie OPJ y OPF (Operon Technologies serie J y F respectivamente). Para un volumen total de reacción de 20 μ l se utilizaron: 20 ng de ADN molde, 0,2 μ M de cebadores, 0,1 mM de diNucleótidos trifosfatos, 2 mM de Cloruro de Magnesio, 1,5 unidades de Taq polimerasa y 2 μ l de 10x "buffer" Taq. Los geles fueron teñidos empleando el "Kit DNA Silver Staining" de Promega.

Resultados Obtenidos

La alta resolución de este procedimiento permitió obtener perfiles característicos para cada genotipo ("Fingerprinting" o huellas "dactilares" del genoma), Fig. 1, y detectar seis (7) bandas polimórficas, específicas de cada variedad, utilizando solamente 5 cebadores (Tabla 1). Esto sirvió para diferenciar en forma inequívoca al clon RA 96-15, que se encuentra en una etapa avanzada de selección clonal, de su progenitor femenino, la variedad estadounidense LCP 85-384. Con este procedimiento se logró, en un lapso breve de tiempo, caracterizar genéticamente dos genotipos emparentados y con características morfológicas tan semejantes que no permitían distinguirlos por los métodos tradicionalmente utilizados.

Conclusiones

El uso de la biotecnología molecular, en este caso concreto el RAPD de Alta Resolución permitió, identificar en forma rápida y económica genotipos que eran fenotípicamente indistinguibles. Cabe destacar que este trabajo constituye la primera incursión de las

técnicas moleculares en el Programa de Mejoramiento de la EEAOC, como una valiosa herramienta para la caracterización de materiales de caña de azúcar en proceso de mejora genética. ■

Tabla 1. Muestra los cebadores utilizados para la caracterización genética; (+) indica presencia y (-) ausencia de la banda diferencial para cada genotipo.

CEBADORES	RA 96-15	LCP 85-384
OPF 3	++	-
OPF 14	-	++
OPF 16	++	-
OPJ 17	++	-
OPJ 20	-	++

Bibliografía Citada

- Aljanabi, S.M, Forget, L, and Dookun, A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 17, 1-8.
- García, G., Ontivero M., Díaz Ricci J y Castagnaro A. 2002. Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. *Plant Breeding* 121, 76-80.
- Harvey, M and Botha, F.C. 1996. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. *Euphytica* 89, 257-265.
- Nair, V, Nair, S, Sreenivasan, T. and Mohan, M. 1999. Analysis of diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Res. and Crop Evol.* 46, 73-79.
- Oropeza, M and Degarcia, E. 1997. Use of molecular markers for the identification of varieties of sugarcane (*Saccharum* sp). *Phyton International Journal of Experimental Biology* 6, 81-85.

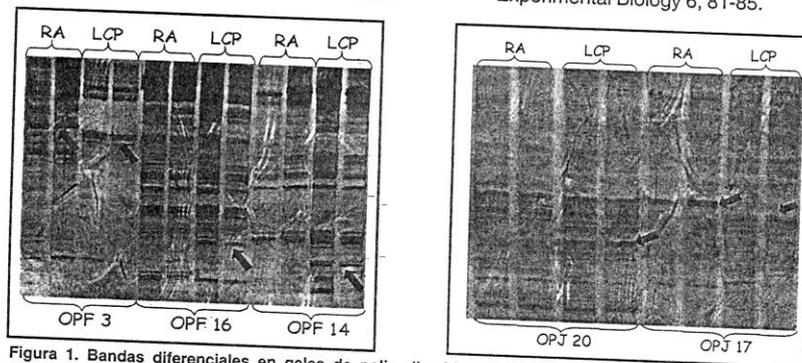


Figura 1. Bandas diferenciales en geles de poliacrilamida. Las flechas indican las bandas presentes en una variedad y ausentes en la otra.