

***UNA APROXIMACIÓN AL MAPA
GENÉTICO DE LA CAÑA DE
AZÚCAR (*Saccharum spp.*) PARA
LAS VARIETADES COLOMBIANAS
USANDO MARCADORES
MOLECULARES MICROSATÉLITES***

***Natalia Campillo P
Dirigido por
Jershon López Gerena Ph.D.***



CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

**Caña de azúcar (*Saccharum*
spp.)**

Familia: Poaceae

Sub – Familia : Panicoideae

Tribu: Andropogoneae

Sub-Tribu: Saccharastrae

Género: *Saccharum*



Mukherjee SK. (1957); Kole. (2007); Jannoo et al., (1999)

Géneros relacionados: Erianthus, Miscanthus, Narenga, Sclerostaquia

Especies	Clasificación	Número de cromosomas
→ S. barberi	Hibrido antiguo	2n= 11-120
S. edule	Especie silvestre	2n= 60-80 con Formas aneuploides
→ S. officinarum	Caña noble	2n= 80
S. robustum	Especie silvestre	2n= 60 – 200
→ S. sinensi	Hibrido antiguo	2n= 80-140
S. spontaneum	Especie silvestre	2n=40-128



Complejo Saccharum

Tomado de: *Buzacott (1965) & Daniela et al ., (1987) citado por Kole (2007)*



S. Officinarum* x *S. spontaneum

$$2n = 80$$

$$2n = 40 - 128$$



$$2n + n$$

$$F1 = 100 - 144$$

$$80 + 20 - 64$$

***S. Officinarum* x F1**

$$2n = 80$$

$$2n = 100 - 144$$



$$2n + n$$

$$BC1 = 130 - 152$$

$$80 + 50 - 72$$

***S. officinarum* x BC1**

$$2n = 80$$

$$2n = 130 - 152$$



$$2n + n$$

$$BC2 = 145 - 156$$

$$80 + 65 - 76$$



Variedades Modernas

Citotipos de *S. Spontaneum*: $2n= 40, 64, 80, 96, 112, 128$.

S.spontaneum* x *S. officinarum

$2n= 80, 96, 112$

(Roach. 1969; citado por D'Hont *et al.*,1996)



$n + n$

S. Spontaneum* x *S. officinarum

$2n= 64$

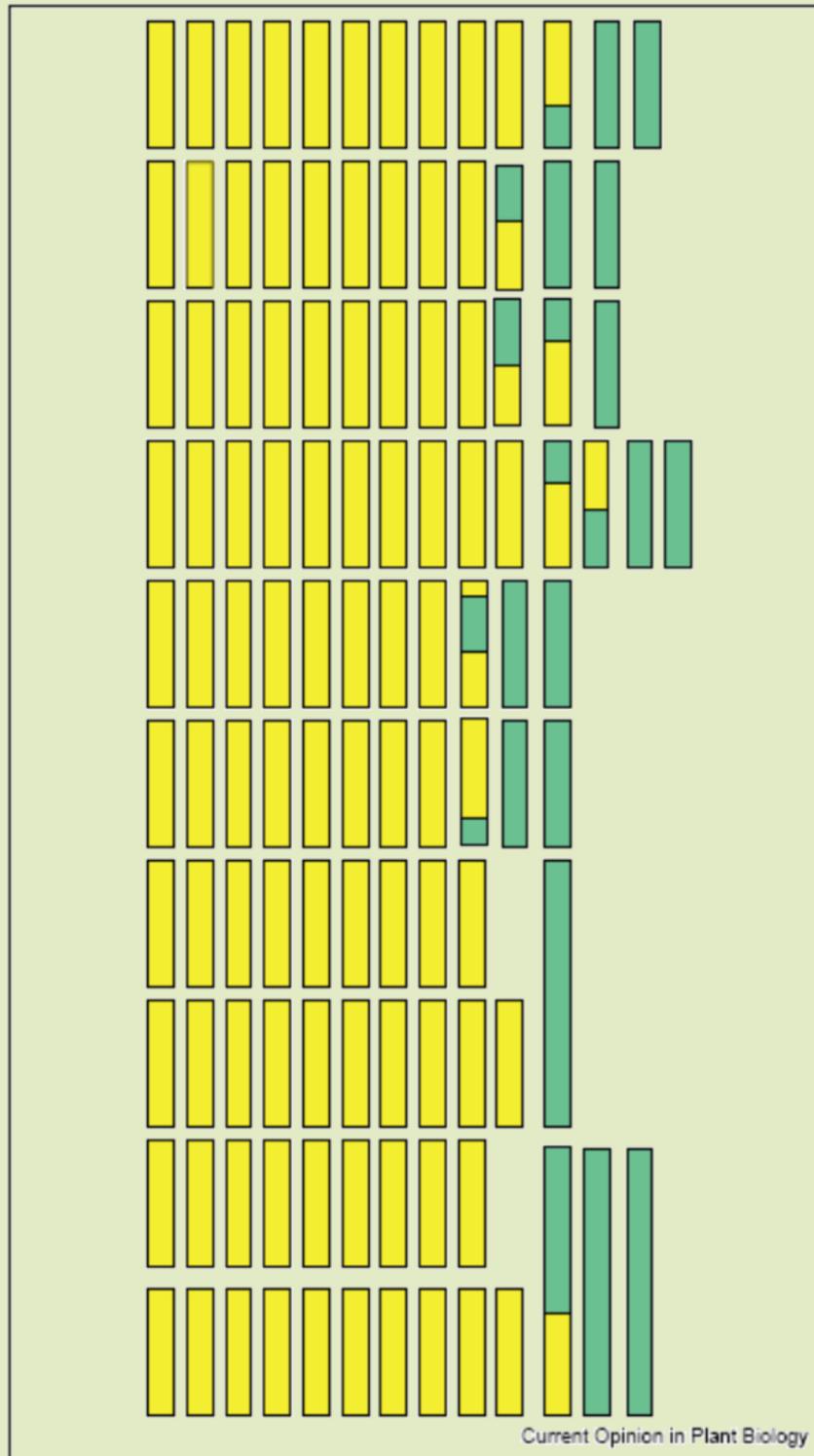
(D'hont *et al.*,1996)



$2n + n$

$n + n$





Arroz - 860Mpb – 2n= 24

Sorgo – 1600Mpb – 2n= 20

Maíz – 5500Mpb – 2n=20

Tomado de: Grivet y Arruda, 2001

10.000 Mpb

2n= 100 -130

Fuente: Grivet y Arruda. 2001; D'hont y Glazmann, 2001 citado por Kole, 2007.

• **Azúcar insumo importante para la industria...**

• **Se han desarrollado:**

- ✓ **13 ingenios azucareros.**
- ✓ **11 productores de alcohol y licores.**
- ✓ **2 Cogeneradores de energía.**
- ✓ **1 Productor de papel.**
- ✓ **1 Industria sucro-química.**
- ✓ **Más de 40 empresas de alimentos y bebidas.**



Fuentes:
Asocaña 2001-2002

<http://www.asocana.com.co/publico/historia.aspx>
consultada el 1 de Marzo de 2009

Aporte a la economía nacional:

PIB Total	1%
PIB Industrial	3%
PIB Agrícola	4%

Aporte a la economía Regional:

PIB Total	6%
PIB Industrial	12%
PIB Agrícola	47%

205.654 Ha de caña de azúcar distribuidas en...

Condiciones agroclimáticas

Fuente:

**<http://www.asocana.com.co/publico/historia.aspx>
consultada el 1 de Marzo de 2009**



CICLO MEJORAMIENTO CONVENCIONAL



Reunión de
recursos de
diversidad y
generación de
híbridos

Liberación y
distribución
de los nuevos
cultivadores

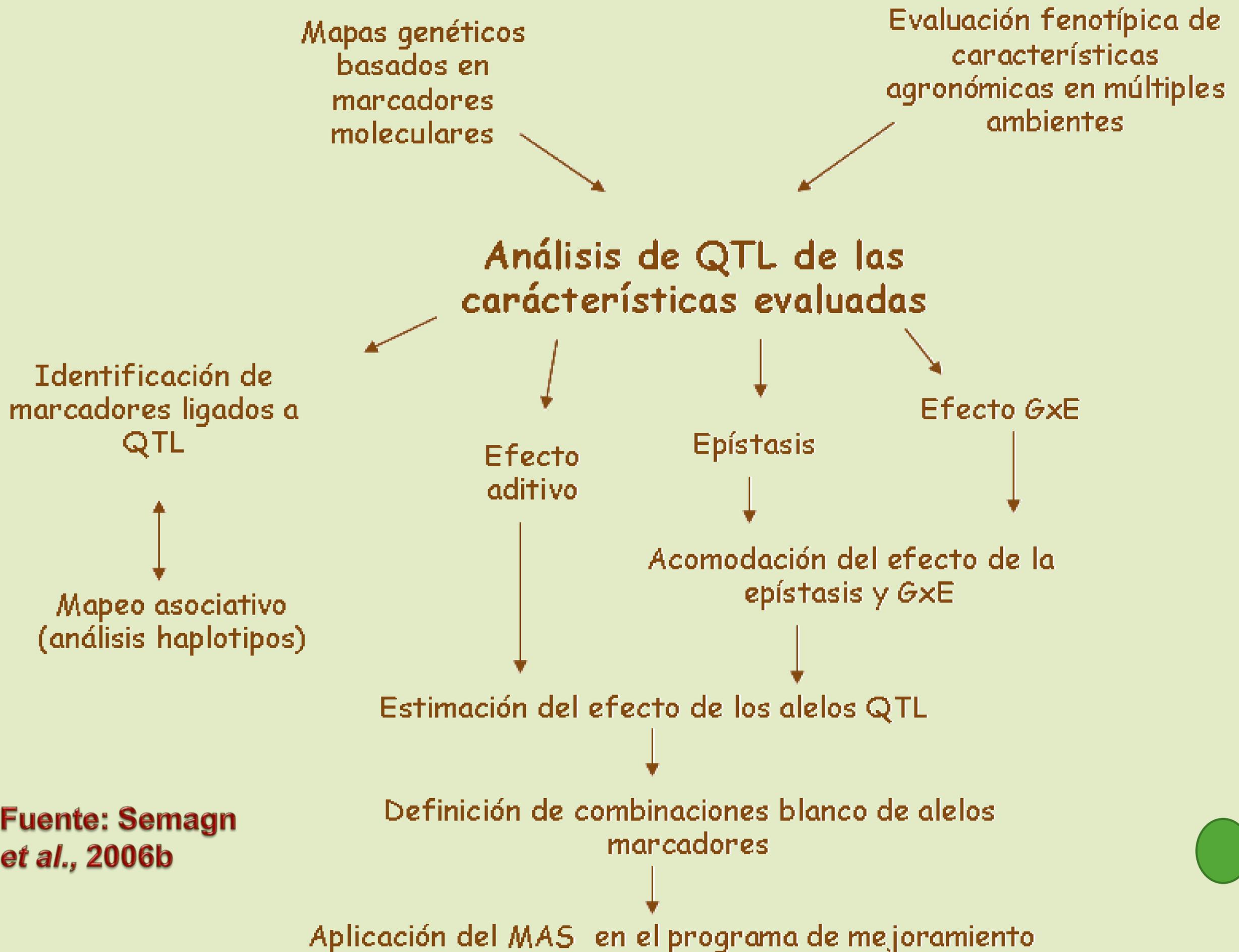
Identificación
de híbridos:
tiempo de
selección y
ambiente

LIMITACIONES

- **Número de generaciones.**
- **Transferencia simultánea de otros genes.**



SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES



**Fuente: Semagn
et al., 2006b**



	Publicación	Especie y Clon	Tipo de marcador	Número y Dosis	Grupos de Ligamiento	Cubrimiento
PRIMERA GENERACIÓN	Al Janabi <i>et al.</i> , 1993	S. spontaneum SES 208	AP - PCR	208 SD	41	
	daSilva <i>et al.</i> , 1993	S. spontaneum SFS 209	RFLP	319 SD	44	
	daSilva <i>et al.</i> , 1995	Unión mapas anteriores	AP - PCR, RFLP	527 SD, DD, TD	64	93%
	Ming <i>et al.</i> , 1998	S. officinarum [Green German (2n=97-117)]	RFLP	270(418)*	72	2,304 cM
		S. officinarum [Mutak Java (2n=140)]	RFLP	206 (355)*	72	1,443 cM
		S. spontaneum[IND 81-146 (2n=52- 56)]	RFLP	248	69	2,063 cM
S. spontaneum [PIN 84 -1 (2n=96)]		RFLP	182	69	1103 cM	

SEGUNDA GENERACIÓN

Grivet <i>et al.</i> , 1996	R570	RFLP	600	98	2008 cM
Hoarau <i>et al.</i> , 2001	R570	AFLP	887 (939)*	120	
Ming <i>et al.</i> , 2002	Mapeo comparativo con <i>Sorghum bicolor</i> (L) y mapa conseso de los mapas de Ming <i>et al.</i> 1998	RFLP	982	13 GH	Cubrimiento de 39,5 a 46% en los 4 mapas, y 70% en el mapa conseso
Rossi <i>et al.</i> , 2003	R570 saturación mapa Hoarau <i>et al.</i> , 2001	RGA y SSR	1169	128,7 GH	menos del 50%
Aitken <i>et al.</i> , 2005	variedad comercial (Q165; 2n=115) X IJ76-514 (2n=80)	AFLP y SSR	910 (967)*	116	9,053,3 cM
García <i>et al.</i> , 2006	variedades pre-comerciales SP80-180 X SP80-4966	RFLP, SSR Y AFLP	357 (1,118)*	131 GC	2,602,4 cM
Oliveira <i>et al.</i> , 2007	variedades pre-comerciales SP80-180 X SP80-4966	EST - SSR	664 (1669)*	192 GC, 14 GH	6,261,1 cM

Objetivo General

Realizar una aproximación al mapa genético para las variedades colombianas de caña de azúcar, usando marcadores microsatélites en el cruzamiento MZC 74-275 x ICA 69-11.



Objetivos Específicos

- **Identificar grupos de ligamiento en variedades colombianas de caña de azúcar usando marcadores microsatélites**
- **Identificar posibles asociaciones o QTL ligados a componentes de contenido de biomasa y sacarosa.**



Metodología

Población
de Mapeo

Característi
- cas
Analizadas

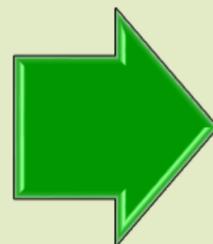
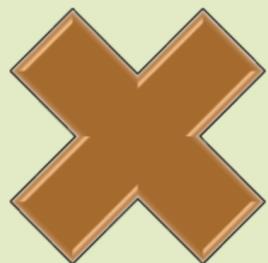
Marcadores
Moleculares
y su
detección

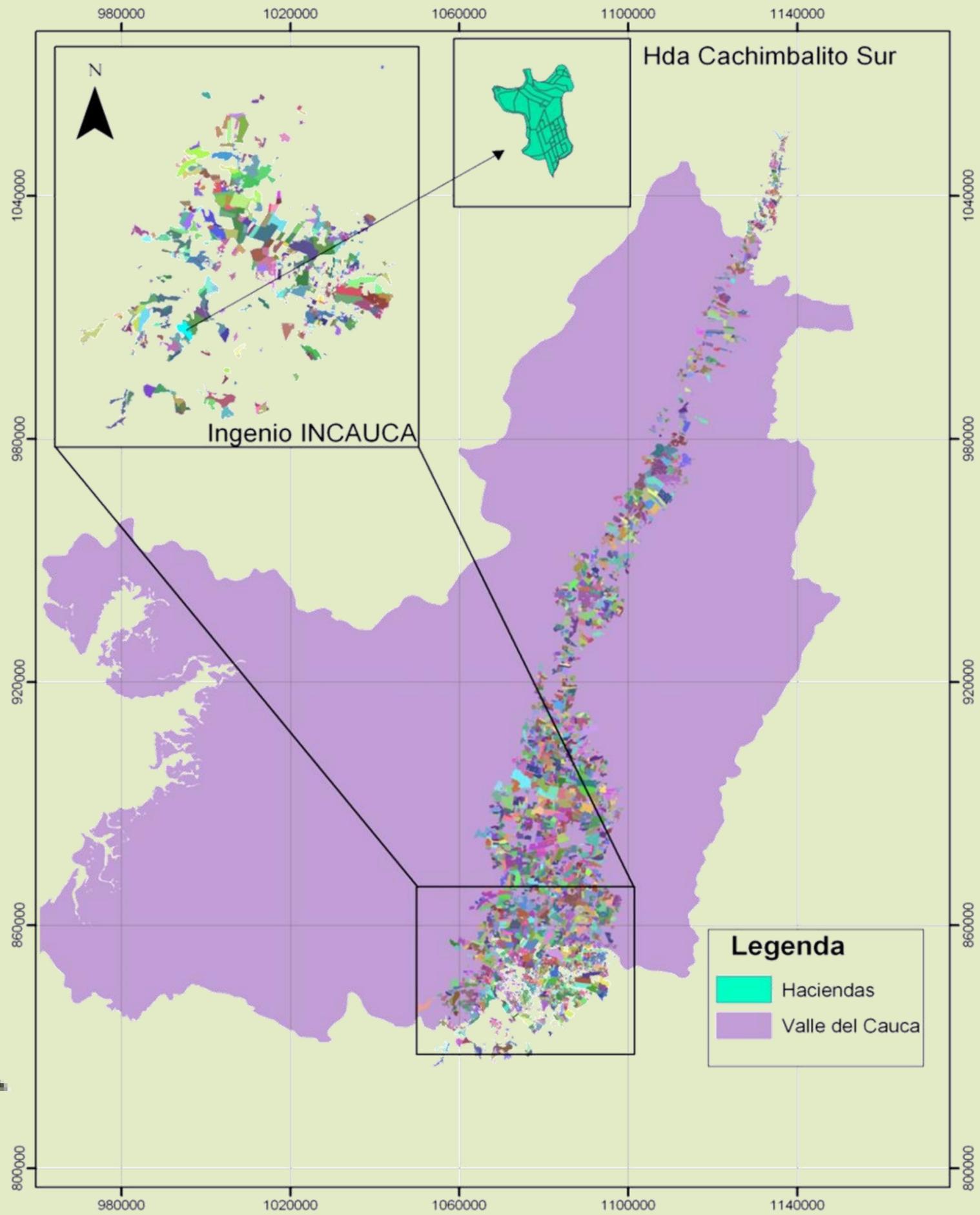
Análisis de
Ligamiento

Análisis
de QTL



POBLACIÓN DE MAPEO





Fuente: CENICAÑA
2009

121	120	396	ICA	295	MZC	219	218	MZC	ICA	111	110	55	54	1
321	322	397	395	298	294	221	217	166	165	114	109	56	53	2
363	24	399	388	299	293	222	216	167	164	115	108	57	52	3
131	220	401	385	300	292	223	215	168	163	116	106	58	51	4
330	144	402	384	301	291	224	214	169	162	117	105	59	50	5
263	95	403	382	302	289	250	213	171	161	118	104	60	49	7
377	44	404	380	303	288	251	212	172	160	119	103	61	47	8
378	191	406	376	304	286	252	211	173	159	120	102	62	46	9
361	107	407	372	305	285	253	210	174	158	123	101	63	45	10
379	126	408	371	306	284	254	209	175	157	124	100	64	43	11
400	98	409	370	307	283	255	207	176	155	125	97	65	42	12
364	6	410	369	308	281	256	205	177	154	128	96	66	41	13
329	28	412	368	309	280	257	204	180	153	129	93	68	40	14
142	MZC	413	366	310	279	258	203	181	152	130	92	69	39	15
112	432	414	360	311	278	259	201	182	151	132	91	70	38	16
326	431	415	353	312	277	260	200	183	150	133	90	71	37	17
323	430	416	352	313	275	262	199	184	149	134	89	72	36	18
33	428	417	351	314	274	264	198	185	148	135	87	73	35	19
276	427	418	350	315	273	265	197	186	147	136	86	74	34	20
206	426	419	349	317	272	266	196	187	146	137	85	76	32	21
27	425	420	345	319	271	267	193	188	145	138	83	77	31	22
287	424	421	342	325	270	268	190	189	143	139	82	78	30	23
296	423	422	341	328	ICA	269	192	ICA	141	140	81	79	29	26

SURCO LIBRE

339	389	426	396	304	256	MZC	169	199	120	ICA	58	82	MZC	46
398	374	376	403	307	259	270	168	211	123	83	55	86	9	47
392	394	427	401	305	255	272	187	218	118	141	56	85	7	49
338	333	380	397	306	260	274	185	215	116	145	60	89	8	51
343	393	430	404	422	251	271	186	212	117	143	57	87	3	54
332	354	372	402	418	257	273	173	196	119	160	59	92	10	52
344	387	432	341	420	254	283	180	213	125	161	68	91	5	53
390	377	371	395	419	285	278	176	197	124	164	66	90	4	50
335	356	431	342	421	253	280	182	217	130	163	65	81	2	41
318	383	115	352	412	286	284	175	214	128	162	64	103	1	35
348	346	425	382	414	303	279	184	216	129	165	63	104	22	38
334	297	114	349	417	288	281	177	190	133	153	62	102	15	37
367	MZC	423	384	413	302	328	181	193	132	157	61	110	26	34
347	203	111	345	415	289	317	174	207	135	154	70	109	19	42
359	221	424	385	416	300	325	183	200	134	155	74	105	21	40
365	275	167	353	408	293	319	189	210	136	158	69	93	14	45
357	351	428	388	410	298	315	166	201	139	159	73	106	16	43
378	294	399	350	407	291	308	188	204	140	147	72	96	17	29
379	277	209	370	409	295	313	172	205	137	146	71	97	23	31
377	198	258	360	406	299	310	250	262	138	152	79	100	13	39
358	252	292	366	269	301	309	171	266	192	149	78	101	12	36
355	314	369	368	268	224	312	222	265	151	150	77	11	18	30
ICA	108	MZC	267	MZC	223	311	219	264	ICA	148	76	20	ICA	32

CARACTERÍSTICAS ANALIZADAS

Características Analizadas	Componentes Producción		Mes toma de Datos		
	Sacarosa	Biomasa	4	12	13
Sacarosa	X			X	X
Pureza	X			X	X
Fibra	X			X	X
Azúcares Reductores	X			X	X
Azúcares Reductores Totales (ART)	X			X	X
Azúcares Reductores Estimados (ARE)	X			X	X
No Sacarosas	X			X	X
Humedad	X			X	X
Materia Seca	X			X	X
Brix	X			X	X
Altura		X	X	X	X
Diámetro		X	X	X	X
Clorofila		X	X	X	X



MARCADORES MOLECULARES Y SU DETECCIÓN

Extracción
ADN

Estandarización
de SSR

Identificación
de
polimorfismos

Evaluación de
SSR en la
población



ESTANDARIZACIÓN DE SSR



Reactivos	Concentración inicial	concentración final	Volumen de cada reactivo para una reacción (ul)
Buffer	10X	1X	1,5
MgCl2	25mM	2,0mM	1,2
dNTP's	8mM	0,192mM	0,36
Iniciadores	10mM	0,67mM	1
Taq polimerasa	5U	0,01U	0,03
ADN	4ng/ul	1,3ng/ul	5
Agua	-	-	5,91
volumen de la reacción	-	-	15

94°C por 3 minutos

94°C por 30 segundos

55°C por 30 segundos

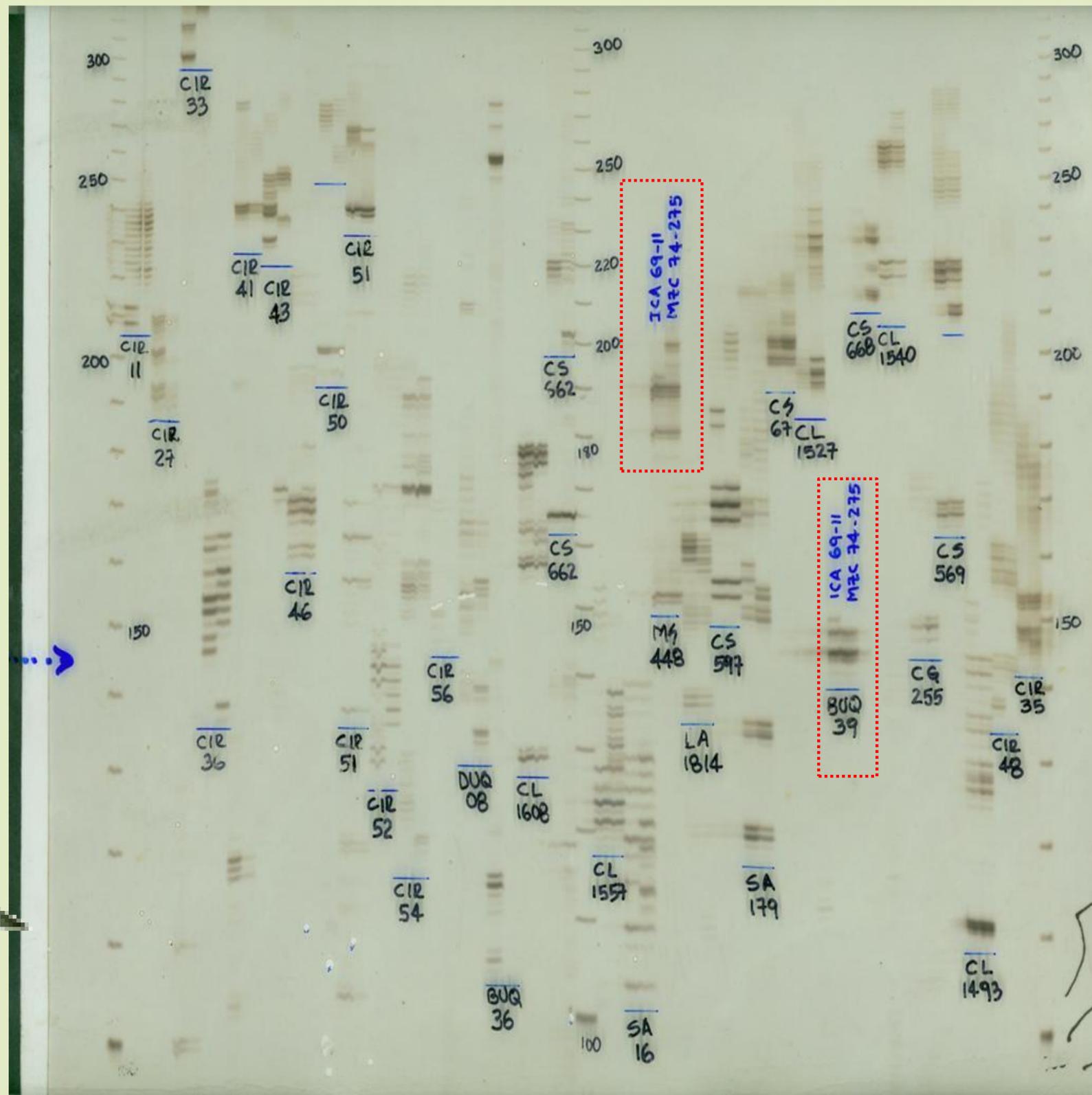
72°C por 45 segundos

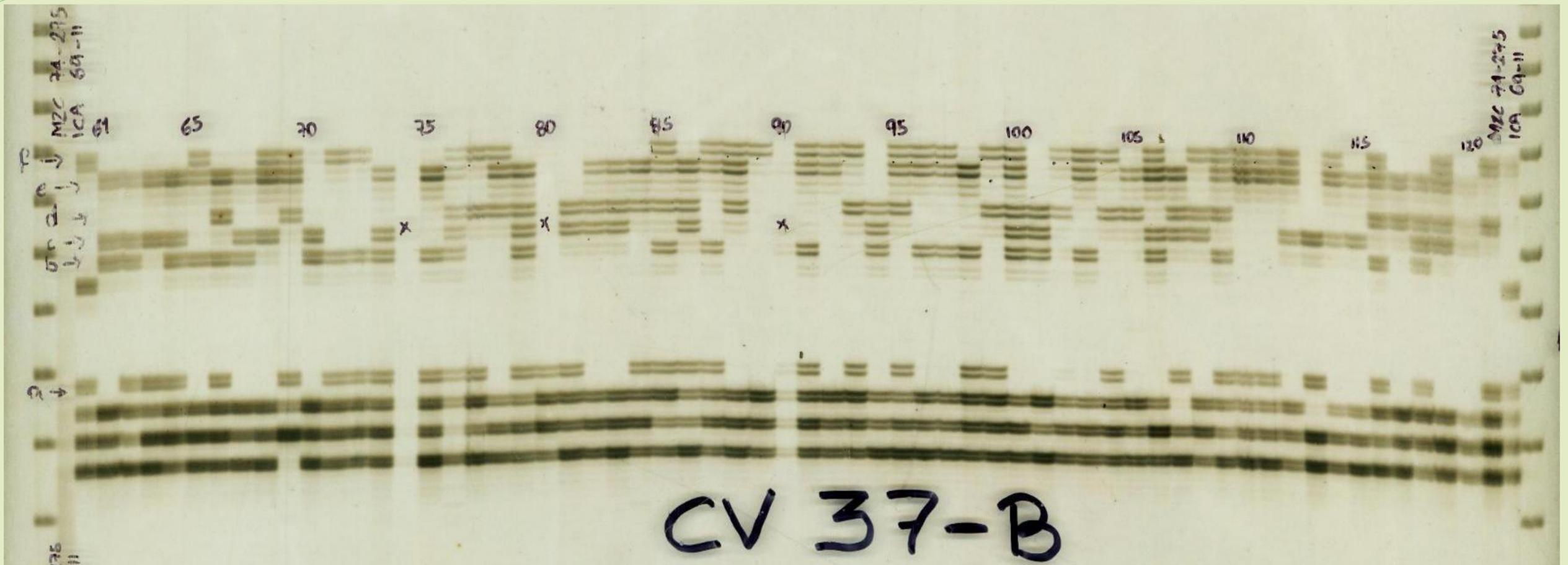
72°C por 5 minutos

10°C ∞

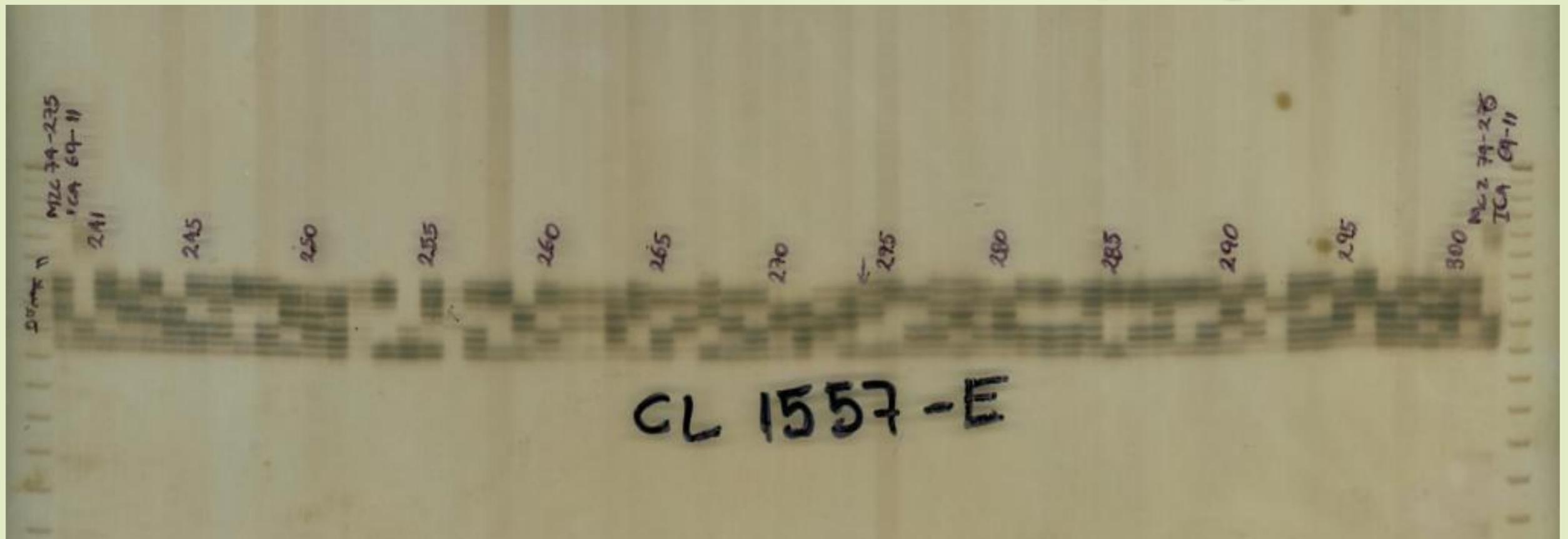
35 Ciclos

IDENTIFICACIÓN SSR POLIMÓRFICOS





Evaluación de SSR en la progenie



ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

Sólo se incluyeron marcadores con segregación 1:1 y 3:1 marcadores de única dosis.

Prueba chi – cuadrado.

LOD 3 y % FR 4.

MAPMAKER V2.0



Análisis de QTL

REGRESIÓN LOGÍSTICA

ANOVA

**Variable explicativa
alelos
marcadores**

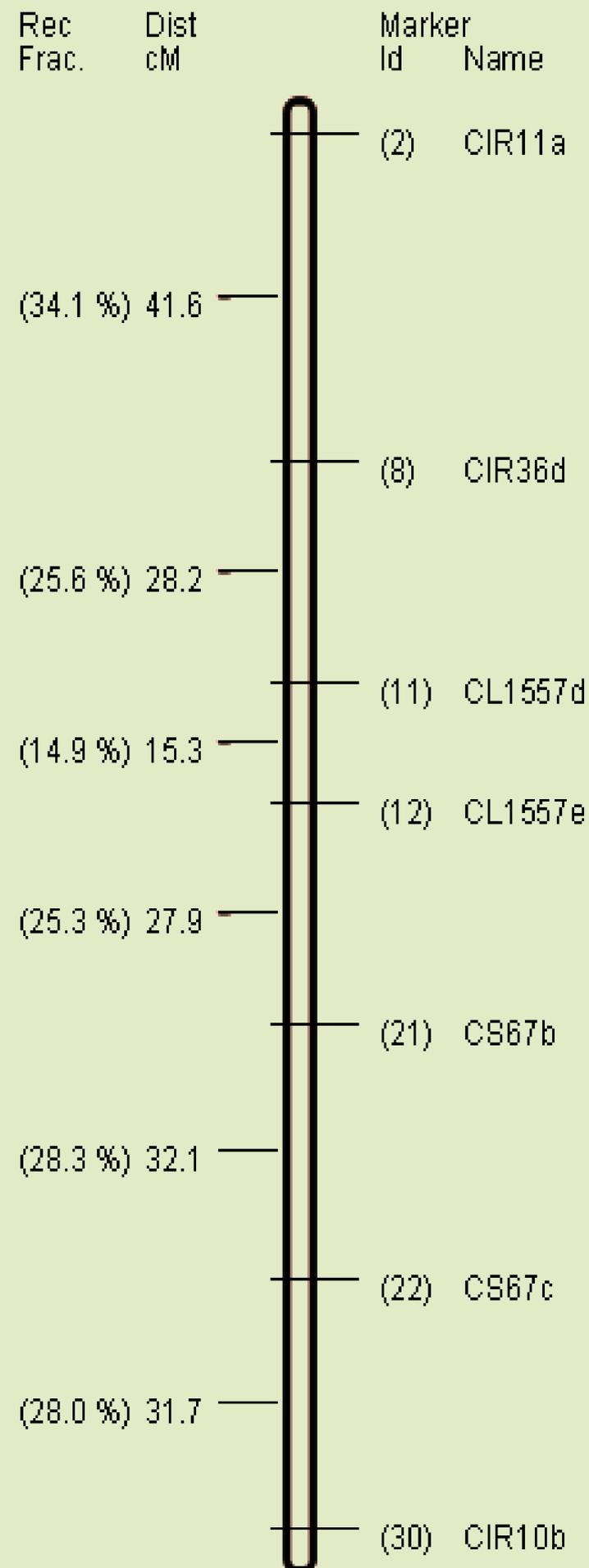
**Variable respuesta
13
características**

**- SAS 9.1.3.
- Corrección de Bonferroni**



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**45 alelos
evaluados.
GL longitud
176.791 cM.**



UBICACIÓN REPORTADA DE ALGUNOS MARCADORES EVALUADOS EN OTROS ESTUDIOS

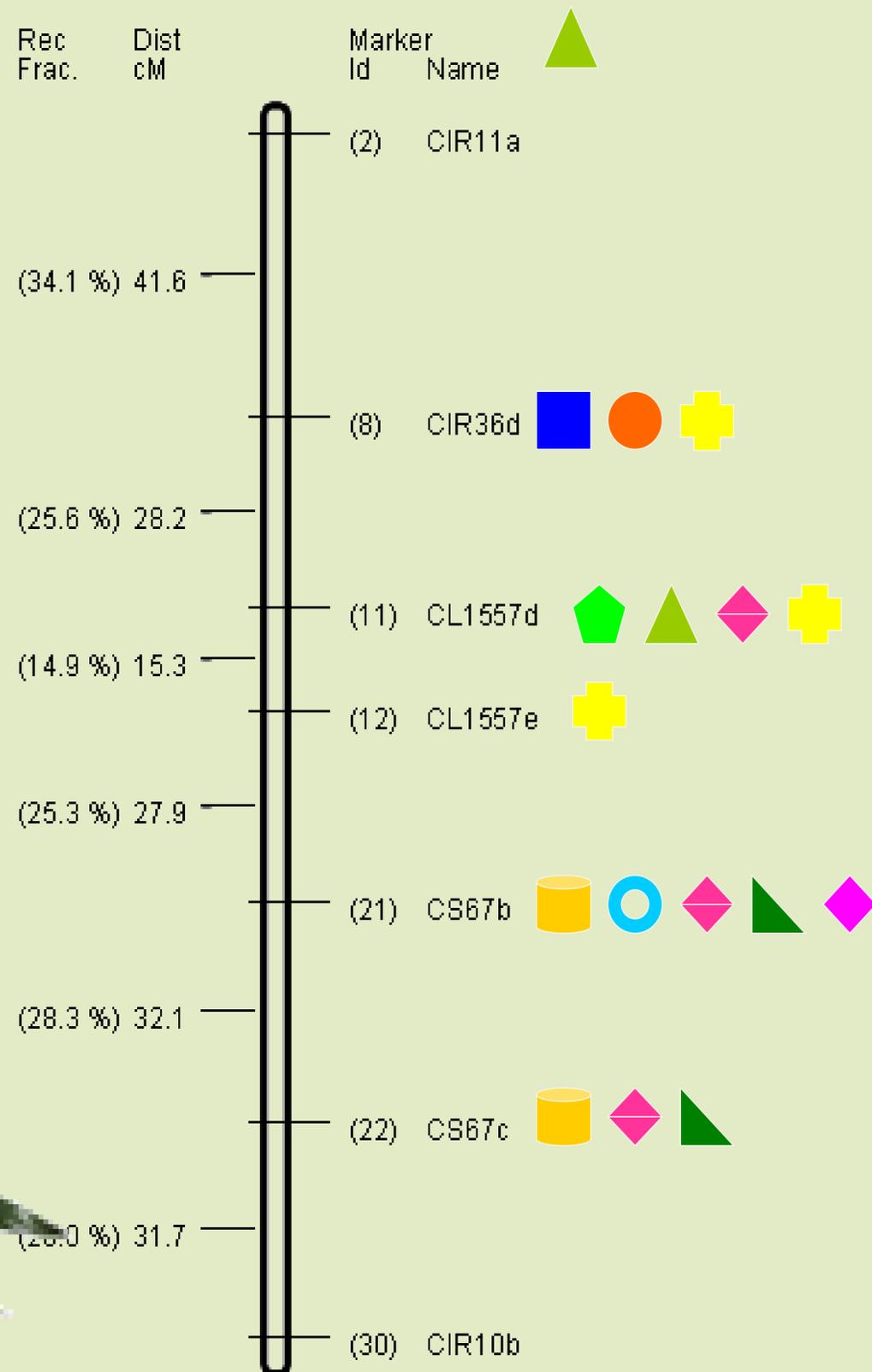
Publicación	Marcador	GL
Aitken et al., 2005	CIR10	23,29
	CIR15	82,71
	CIR19	78,12b
	CIR24	67
	CIR32	93,28,63
García et al., 2006	CIR36	17,42,9,19,114 , 27
	CIR52	83,21
	CL1608	65,24,108
	CIR36	I-3; I-5; I-4; I-1
	CIR32	XI-1; XI-2
	CIR18	



- **Complejidad genómica de la caña de azúcar ha dificultado la elaboración de mapas genéticos.**
- **Se hace necesario entender su estructura genómica:**
 - **Formas de transmisión ($2n+n$ ó $n+n$)**
 - **Formas de segregación.**
 - **Número de cromosomas (Hoarau *et al.* 2001).**



ANÁLISIS DE QTL ANOVA



AZÚCAR		MATERIA SECA
		FIBRA
		%HUMEDAD
		SACAROSA
		% PUREZA
		ARE
BIOMASA		% BRIX
		ART
		CLOROFILA
		DIAMETRO



Marcador	ligado	AL		DM		CL			SAC		BRIX		HM		AR		MS		ARE		ART		FB		PZ		NS	
		4	12	4	13	4	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13
BS334a					*																							
BS334b		*	*				*								*													
CG236d							**					*				*												
CG236f												*				*						*						
CIR11a	x						*																					
CIR15a					*							**				**						****						
CIR18a		****							*	*	*				*	*	*	*	*	*				*				
CIR18b																							*					
CIR19a																												
CIR19b					*																							
CIR31c					*																							
CIR32b					****		*																					
CIR32c											**			**	***			***		**				***	***			
CIR32d												***	*			***	*			***								
CIR36a						**																						
CIR36c		*		*				*	*	**	*	*		**	***	*		*	*	*			*	*	*			
CIR36d	x																							*	*			
CIR36e														*	***													
CIR40a			*																									
CIR40b									*									*		*			*	*				
CIR47a		*																										
CIR47b			**	*		*																**						
CIR48d					*																							
CIR52b					*																							
CL1557d	x			***		*****									***							*						
CL1557e	x																					**						
CL1608					*																							
CS668b					**																							
CS67b	x								*	*				**			*	*	*		*	*		*	*			
CS67c	x								**					*			**	*	**									
CV37d									**	*	**	*				*	**	*	*				*					

Pleiotropía -Ming et al.,(2002) producción de azúcar y peso del tallo

-Aitken et al., (2008) 4 marcadores asociados a Brix y Pol

Marcador	Característica	Edad (meses)	<i>p</i>
CIR 18a	Altura	4	0,0016
CIR 15a	% Fibra	12	0,0016
CIR 32	Clorofila	4	0,0001
CL1557			

Marcador	Característica	Edad (meses)	<i>p</i>
CIR 18a	% Sacarosa	13	0,0372
	% Brix		0,0459
	% Humedad		0,021
	% Materia Seca		0,021
	% ARE		0,0432
	% ART		0,0319
	% Pureza		0,0417
CIR 15	Clorofila	4	0,0323
	% Humedad		0,0198
CIR 32c	%Humedad	12	0,0037
	% Materia Seca		0,0037
	% Fibra		0,0045

Piperidis et al., (2008) CIR 36 (*p*= 0.005), CIR10 (*p*=0.005), CIR 18 (*p* = 0.01).



Marcador	Característica	Edad (meses)	<i>p</i>	
CIR 36	Altura	12	0,05	
	Diámetro			
	% Humedad			
	% Materia seca			
	% ART			
	% Brix	13		
	% No sacarosa			
	% Sacarosa	12 y 13		
	% ARE			
	% Pureza			
	% Brix	12		0,01
	% AR			
	Clorofila			
% AR	13	0,005		

Piperidis et al., (2008) reportó asociación a % Brix $p = 0.01$ de CIR 36



ANÁLISIS REGRESIÓN LOGÍSTICA

- **Establecer cómo es el comportamiento de los alelos marcadores en conjunto.**
- **Establecer cuál es su aporte y efecto.**
- **¿su variación cambia de acuerdo a la interacción con otros alelos marcadores?.**

ALTURA A LOS 4 MESES

Regresión logística con marcadores asociados identificados con ANOVA

Parámetro	Estimado	Error estándar	Razón de la probabilidad
CIR36c=0	-0,550372	0,397973	0,576735
CIR47a=0	-0,912422	0,320147	0,40155
BS334b=0	-0,743485	0,322755	0,475454
CIR18a=0	0,161828	0,365881	1,17566

Source	Variación	Df	p-Valor
Modelo	7,13449	4	0,1289

Porcentaje de varianza explicada por el modelo= 4,32485

ALTURA A LOS 4 MESES

Regresión logística con todos los marcadores

Parámetro	Estimado	Error estándar	Razón de probabilidad
CIR10a=0	1,37337	0,710619	3,94862
CIR10b=0	2,7826	1,43082	16,161
CIR31c=0	-1,55516	0,774971	0,211155
CIR31f=0	-1,39365	0,664988	0,248169

Source	Variación	Df	p-Valor
Modelo	13,6053	4	0,0087

Porcentaje de variación explicado por el modelo = 22,4617

PORCENTAJE DE FIBRA A LOS 12 MESES

Regresión logística con marcadores asociados identificados con ANOVA

Parámetro	Estimado	Error Estandar	Razón de probabilidad
CG236f=0	-0,944208	0,295495	0,388987
CIR15a=0	-0,114544	0,304602	0,891773
CIR32d=0	0,486658	0,374675	1,62687
CIR47b=0	-0,110294	0,365686	0,895571

Source	Variación	Df	p-Valor
Modelo	-15,1384	4	1,0000

Porcentaje de variación explicado por el modelo = -8,54161

PORCENTAJE DE FIBRA A LOS 12 MESES

Regresión logística con todos los marcadores

Parámetro	Estimado	Error estándar	Razón de probabilidad
CIR11b=0	-3,38125	1,33234	0,0340049
CIR36e=0	-3,06115	1,25849	0,0468339
CIR52a=0	-2,89476	1,19544	0,0553126
CIR40a=0	2,74311	1,18686	15,5352
CIR32a=0	3,32654	1,33237	27,842

Source	Variación	Df	p-Valor
Model	21,9432	5	0,0005

Porcentaje de varianza explicado por el modelo = 34,2092

- **Los alelos marcadores asociados identificados con el análisis de varianza son insuficientes para explicar la variación de las características.**
- **Se aumenta la explicación de la variación con el análisis de regresión logística incluyendo todos los marcadores así mismo la significancia estadística de los modelos.**

CLOROFILA A LOS 4 MESES

Regresión logística con marcadores asociados identificados con ANOVA

Parámetro	Estimado	Error estándar	Razón de probabilidad
CIR15a=0	-0,643032	0,412809	0,525696
CIR19b=0	0,475976	0,40731	1,60958
CIR31c=0	-0,62286	0,395929	0,536408
CIR47b=0	-0,0105227	0,448475	0,989533
CL1557d=0	-0,395542	0,78053	0,673315
CL1608b=0	0,650928	0,368512	1,91732
CS668b=0	-0,977059	0,408709	0,376416

Source	Variación	Df	p-Valor
Model	15,2431	7	0,0330

Porcentaje de variación explicado por el modelo = 10,41

CLOROFILA A LOS 4 MESES

Regresión logística con todos los marcadores

Parámetro	Estimado	Error estándar	Razón de probabilidad
CL1557d=0	-16,2604	505,776	8,67355E-8
CL1557e=0	15,5712	505,777	5,78729E6
CIR31c=0	-0,92178	0,33971	0,39781

Source	Variación	Df	p-Valor
Modelo	24,9947	3	0,0000

Porcentaje de variación explicado por el modelo = 16,186

Las probabilidades y proporciones aportadas por cada alelo marcador a la característica dependen de la interacción entre alelos marcadores

ALELO MARCADOR	REGRESIÓN LOGÍSTICA CON MARCADORES IDENTIFICADOS CON ANOVA		REGRESIÓN LOGÍSTICA CON LOS 45 ALELOS MARCADORES	
	Razón de la probabilidad	p- Valor del modelo	Razón de la probabilidad	p- Valor del modelo
CL 1557d	0,673315	0,0330	8,67355E-8	0,0000
CIR31c	0,536408		5,78729E6	

**ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA
PARA TODAS LAS
CARACTERÍSTICAS INCLUYENDO
LOS 45 ALELOS MARCADORES.**



CONCLUSIONES

- Con el análisis de varianza se encontraron cuatro marcadores asociados con valores de p significativos (CIR18a, CL1557d, CIR32c, CIR15a).
- Marcadores asociados a más de una variable, confirmando reportes anteriores.



CONCLUSIONES

- Se reportan asociaciones a diferentes características en distintas edades del cultivo.
- Se confirma la asociación de los marcadores CIR18 y CIR36 a Brix reportada por Piperidis *et al.*, (2008).



CONCLUSIONES

- **Con el análisis de regresión logística se encontraron asociaciones diferentes a las encontradas con el ANOVA y nuevos marcadores que tampoco habían sido identificados.**
- **Con este análisis se determinó que el aporte de cada marcador a la característica está determinado por la interacción con otros marcadores.**



CONCLUSIONES

- Es necesario aumentar el número de marcadores con el objetivo de encontrar combinaciones de marcadores que expliquen porcentajes de variación más altas.
- Las combinaciones de alelos marcadores reportadas en este estudio, son específicas del ambiente y de los marcadores evaluados en el mismo.



CONCLUSIONES

- Todos los resultados reportados en este estudio son preliminares.
- Este trabajo es el primera paso de un largo camino por recorrer en el entendimiento del genoma de la caña de azúcar para las variedades Colombianas.



RECOMENDACIONES

**Aumentar número de marcadores SSR,
AFLP.**

Mapeo comparativo.

Información citogenética.



AGRADEZCO SINCERAMENTE

A CENICAÑA y COLCIENCIENCIAS quienes financiaron este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de CENICAÑA por todos los buenos momentos y su compañía.

A Eliana Macea por su amistad , ayuda y consejos.

A los profesores Maria Dolly García y Hernando Hurtado por su valiosa colaboración en el análisis estadístico.

A la Universidad del Quindío por mi formación.

A las dos personas que son eje central en mi vida:

mi hermana por su cariño, amistad y ayuda incondicional

mi madre, a quien va dedicado este gran esfuerzo, gracias por tu guía y tu cariño constante.

¿PREGUNTAS?

