

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES CUBANAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp) MEDIANTE AFLP

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUBAN SUGARCANE VARIETIES (*Saccharum* spp) BY AFLP

Ariel Arencibia¹, Miladys Delgado¹, Héctor Jorge¹, Orlando Coto^{2*}, Ibis Jorge¹ y Héctor García¹

¹Programa de Fitomejoramiento, Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carr. CUJAE. Km 2.5, Marianao 19390. Ciudad de la Habana, Cuba. ²Departamento de Bioplasmas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Apartado 6714. Ciudad de la Habana, Cuba.

*Dirección actual: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Ave. 7ma., No. 3005, Apartado 11 300, Playa. Ciudad de la Habana, Cuba

* Autor para correspondencia

RESUMEN

El programa de Fitomejoramiento del Instituto Nacional de Investigación en la Caña de Azúcar de Cuba, recomienda 34 genotipos de caña de azúcar de alto valor comercial los cuales fueron el caracterizado molecularmente mediante el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; AFLP). Esta técnica permitió la identificación individual por sus patrones de ADN amplificado con las copias de cebadores 5'-GACTGCGTACATGCAac-3', 5'-GATGAGTCCTGAA GATAGaca-3', y 5'-GACTGCGTACATGCAaa-3', 5'-GATGAGTCCTG AAGATAGgaa-3'. Se constató la utilidad de los AFLPs como herramienta para la caracterización de individuos con alta similitud genómica. Mediante el análisis de agrupamiento basado en la distancia de Dice, el método basado en las medias aritméticas no ponderadas y el análisis factorial de correspondencias simples (FAC) se confirma que la base genética de los cultivares comerciales actuales de caña de azúcar en Cuba es muy estrecha. Estos resultados también contribuyen a facilitar la identificación, comercialización e intercambio de estos genotipos.

Palabras clave: *Sacchanum* spp, AFLP, caracterización molecular, identificación de variedades.

SUMMARY

A total of 34 high-commercial value sugarcane genotypes recommended by the Genetic Improvement Program of the National Institute for Sugarcane Research of Cuba, were characterized by AFLPs as molecular approach. Identification of the individuals by their DNA amplification patterns was possible using the copy primers 5'-GACTGCGTACATGCAac-3' 5'-GATGAGTCCTGAAGATAGaca-3' and 5'-GACTGCGTA CATGCAaa-3' 5'-GATGAGT CCTGAAGATAGgaa-3'. Utility of AFLP markers as a tool for characterization of individual's carrying high genomic similarity was corroborated. The use of cluster analyses and factorial analysis of correspondences (FAC) confirmed that the genetic basis of the modern sugarcane commercial varieties in Cuba is very narrow. Results are a complementary tool for the identification of these genotypes and give an additional value for their commercialization and exchange.

Index Words: *Sacchanum* spp, AFLP, molecular characterization, varietal markers.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente las variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) utilizadas como progenitores y las seleccionadas en los programas de mejoramiento genético han sido caracterizadas e identificadas mediante marcadores morfológicos y agronómicos (Pérez *et al.*, 1997). Sin embargo, en los últimos años la caracterización de especies vegetales ha sido auxiliada de otros marcadores que pueden ser fisiológicos, bioquímicos, citogenéticos y moleculares (Cooke y Reeves, 1998).

Los marcadores del polimorfismo de ADN (marcadores moleculares) son herramientas valiosas para los estudios genéticos en plantas, y en algunos casos están siendo empleados exitosamente en la elección de progenitores y mejoramiento de la caña de azúcar (Glaszmann y D'Hont, 1999). Varios tipos de marcadores moleculares y estrategias de mejoramiento se encuentran a disposición de mejoradores y genetistas, los cuales permiten superar muchas de las limitaciones de los programas de mejoramiento tradicional (Weising *et al.*, 1998).

El desarrollo de marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*; PCR), como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; AFLP) y los microsatélites, han revolucionado estas tecnologías al presentar un alto nivel de confiabilidad (Donini *et al.*, 2000; Rodríguez y Arencibia, 2002).

La necesidad de utilizar herramientas de alta precisión se ve incrementada por el aumento en tamaño de las colecciones de germoplasma de especies vegetales, así como por el número de variedades que se obtienen anualmente, las cuales deben cumplir los requisitos de ser distintas, uniformes y estables, para ser registradas y comercializadas como nuevas variedades (Donini *et al.*, 2000).

En caña de azúcar los marcadores moleculares se han aplicado para la caracterización de la diversidad genética del germoplasma silvestre (D'Hont *et al.*, 1995; Coto *et al.*, 2002), la identificación y el manejo asistido de los recursos genéticos (Cornide *et al.*, 2000), la caracterización e identificación de plantas transgénicas (Arencibia *et al.*, 1999) y la identificación de secuencias expresadas relacionadas con la resistencia a enfermedades a partir de variantes somaclonales (Carmona *et al.*, 2000; 2004). Una serie de mapas de ligamiento se han reportado en caña de azúcar utilizando marcadores basados en el ADN amplificado al azar (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) (Al-Janabi *et al.*, 1993; Mudge *et al.*, 1996); otros basados en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) (Grivet *et al.*, 1996; Ming *et al.*, 1998; 2002), AFLPs (Hoarau *et al.*, 2001) y microsatélites (Rossi *et al.*, 2003), también han sido reportados.

Acercas de la caracterización de variedades comerciales existe una base de datos en un proyecto de la Estación Experimental de la Caña de Azúcar de África del Sur, la cual se basa en los perfiles de ADN genómico amplificado por AFLPs (Huckett *et al.*, 2002).

El presente trabajo ofrece la caracterización molecular mediante AFLPs de variedades comerciales recomendadas por el Programa de Fitomejoramiento del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) de Cuba. Se espera así demostrar la factibilidad y potencialidad del uso de estos marcadores como herramienta para apoyar al programa de mejoramiento genético y recomendar genotipos de caña de azúcar con interés agronómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron 34 variedades recomendadas por la red experimental del Programa de Fitomejoramiento del INICA (Cuadro 1). De cada genotipo se tomaron cinco plantas representativas por sus características botánicas y agroindustriales, de acuerdo con Jorge *et al.* (2002).

Cuadro 1. Variedades comerciales cubanas en las que se hizo caracterización molecular AFLP's.

Código	Genotipo		Progenitores		País
1	C87-252	Akbar	x	?	Cuba
2	C90-469	C90-467	x	Ja60-5	Cuba
3	C90-501	C266-70	x	Ja60-5	Cuba
4	C90-317	C187-68	x	B6368	Cuba
5	C90-530	My5514	x	Co421	Cuba
6	C86-165	B42231	x	C227-59	Cuba
7	SP70-1284	CB41-76	x	?	Brasil
8	C89-147	C236-51	x	B45181	Cuba
9	C88-187	C227-59	x	My5514	Cuba
10	C88-523	CP52-43	x	C1051-73	Cuba
11	C90-105	C8-76	x	?	Cuba
12	C89-148	B6368	x	CP70-1143	Cuba
13	C86-56	NCo310	x	C187-68	Cuba
14	C86-156	C16-56	x	C87-51	Cuba
15	Q68	POJ2878	x	Co290	Australia
16	C89-250	Eros	x	Ja64-11	Cuba
17	C88-380	B7542	x	B63118	Cuba
18	B78505		Desconocidos		Barbados
19	C89-161	C12-56	x	C87-51	Cuba
20	C89-176	NCo310	x	C187-68	Cuba
21	C86-251	CP29-103	x	Co421	Cuba
22	C88-356	CP52-43	x	C187-68	Cuba
23	C88-381	C389-52	x	C227-59	Cuba
24	C88-556	CP44-155	x	B45181	Cuba
25	C86-554	My5715	x	My5514	Cuba
26	C90-647	C389-52	x	Mex60-1459	Cuba
27	C85-403	C87-51	x	Ja60-5	Cuba
28	C86-406		Desconocidos		Cuba
29	C86-12		Desconocidos		Cuba
30	C128-83	CP52-43	x	Ja60-5	Cuba
31	C86-503	C568-75	x	Ja60-5	Cuba
32	Co997	Co683	x	C63-32	India
33	C132-81	B7542	x	B63118	Cuba
34	C137-81	B74343	x	Merceditas	Cuba

Análisis de los datos.

Las bandas de ADN obtenidas en el rango de mejor resolución (aproximadamente entre 120 y 1100 pb) de los geles fueron procesadas como un carácter binario por su presencia (1) o ausencia (0). Las bandas producidas por las diferentes variedades fueron consideradas como idénticas cuando mostraron igual migración en el gel. Se realizó un análisis de agrupamiento por similitud genética estimada según el coeficiente de Dice y mediante el algoritmo secuencial, aglomerativo, jerárquico y anillado (*Sequential, Agglomerative, Hierarchical and Nested*, SAHN); como método de agrupamiento a la media aritmética no ponderada (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average*, UPGMA), porque presenta los valores cofenéticos más adecuados. Se utilizó para ello el paquete de programas NTSys-PC versión 2.1. Las bandas más discriminadoras fueron determinadas a partir de un Análisis Factorial de Correspondencias Simples (FAC) (STATITFC 4.0, 1988) efectuado de forma iterativa con la matriz de datos originales (Benzecri, 1973) al considerar a las bandas de AFLP como variables.

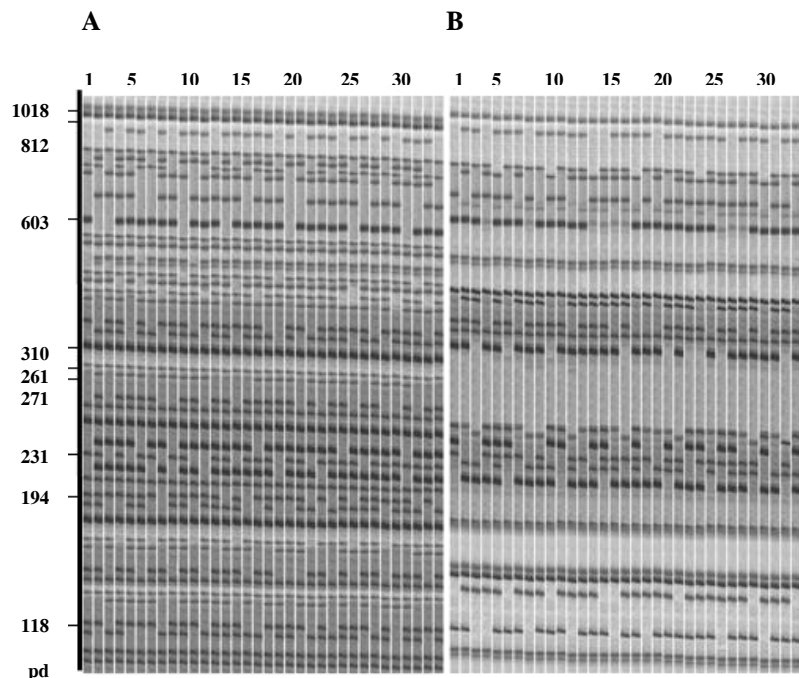


Figura 1. Patrones de AFLP del ADN genómico de 34 genotipos comerciales de caña de azúcar *Saccharum* spp. del Programa de Fitomejoramiento del INICA. El ADN se obtuvo a partir de 1 g de hojas de cinco plantas por cada genotipo. Para la restricción del ADN se utilizaron las enzimas *Pst* I y *Mse* I y la amplificación se hizo con las copias de cebadores 5'- GACTGCGTACATGCAac / 5'- GATGAGTCCTGAAGATAGaca y 5'- GACTGCGTACATGCAaa / 5'- GATGAGTCCTGAAGATAGgaa, para las reacciones A y B, respectivamente. Los productos fueron separados en gel poliacrilamida 9 % y evidenciados mediante tinción de AgNO_3 . Marcador de peso molecular ΦX174 DNA / *Hae* III. Los códigos de las variedades son los siguientes: 1. C87-252; 2. C90-469; 3. C90-501; 4. C90-317; 5. C90-530; 6. C86-165; 7. SP70-1284; 8. C89-147; 9. C88-187; 10. C88-523; 11. C90-105; 12. C89-148; 13. C86-56; 14. C86-156; 15. Q68; 16. C89-250; 17. C88-380; 18. B78-505; 19. C89-161; 20. C89-176; 21. C86-251; 22. C88-356; 23. C88-381; 24. C88-556; 25. C86-554; 26. C90-647; 27. C85-403; 28. C86-406; 29. C86-12; 30. C128-83; 31. C86-503; 32. Co997; 33. C132-81; 34. C137-81.

RESULTADOS

A partir de la zona de mejor resolución en los geles de poliacrilamida, establecida para estos experimentos y situada aproximadamente entre 120 y 1100 pb, los productos de la amplificación mediante AFLP del ADN genómico de las 34 variedades de caña de azúcar, se originaron para la copia de cebadores GACTGCGTACATGCAac - GATGAGTCCTGAAGATAGaca (Figura 1A), un total de 42 bandas de las cuales 23 resultaron polimórficas. La copia de cebadores GACTGCGTACATGCAaa - GATGAGTCCTGAAGATAGgaa (Figura 1B) evidenció un total de 27 bandas, 17 de ellas polimórficas. Los porcentajes de polimorfismos fueron 57.8 y 63.0, para cada combinación de cebadores, respectivamente.

Estos resultados contrastan con los obtenidos mediante otro tipo de marcador molecular como RFLP, para la caracterización de estas mismas variedades, cuando al utilizar dos combinaciones enzima-sonda no se encontraron bandas polimórficas (datos no mostrados).

Esto puede ser explicado por las siguientes razones:

1. Los RFLPs son técnicas de bajo volumen exploratorio del genoma, en comparación con los AFLPs (Donini *et al.*, 2000), ya que en estos últimos se pueden amplificar entre 50-70 fragmentos en promedio. Reportes recientes en caña de azúcar demuestran la utilidad de los marcadores AFLPs en los estudios de mapeo genético por el alto número de fragmentos polimórficos que este tipo de marcador proporciona (Aitken *et al.*, 2005).

2. Número limitado de combinaciones enzima-sondas utilizadas en los análisis mediante RFLP.

3. Todos los genotipos estudiados fueron seleccionados en la red experimental del programa de fitomejoramiento cubano para características agroindustriales y fitopatológicas similares.

El análisis de agrupamiento basado en los datos de similitud genética estimados con el coeficiente de Dice (Figura 2) muestra una baja variabilidad entre genotipos. Los resultados del análisis de remuestreo indican la conveniencia de no considerar la formación de grupos de diversidad debido a los bajos valores de ajuste presentado por los posibles agrupamientos (datos no mostrados).

Con el propósito de determinar bandas o patrones de bandas para la identificación molecular, se analizaron de forma iterativa los patrones polimórficos de todas las variedades, mediante análisis factorial de las correspondencias simples. Los valores de los tres primeros ejes principales E1, E2 y E3, explican 9.48 %, 8.12 % y 5.91 %, de la variabilidad total respectivamente; en su conjunto los tres ejes logran explicar sólo 23.51 % de la varianza experimental total (Cuadro 2). La contribución de las bandas polimórficas a cada una de las componentes se muestra en el Cuadro 3. Se demuestra nuevamente una baja variabilidad genómica entre los genotipos estudiados, de forma que ninguna de las bandas de mayor peso en la diferenciación, bandas A1, A7 y A11 pertenecientes a la primera combinación de cebadores, y los fragmentos B10, B11 y B15 de la segunda combinación (Cuadro 3), pueden ser consideradas independientemente para la identificación de alguna de las variedades estudiadas. Estos resultados permiten resumir que la identificación de los genotipos deberá ser por sus patrones completos de amplificación con las copias de cebadores utilizadas.

La representación espacial del análisis factorial de correspondencias simples nuevamente mostró que no existen agrupamientos definidos de los individuos en el plano de los dos primeros ejes (E1-E2) (Figura 3), lo que corrobora los resultados alcanzados en el análisis de agrupamiento (Figura 2).

DISCUSIÓN

La principal limitación de los programas de mejoramiento de caña de azúcar se debe a que los cultivares modernos son descendientes de unos pocos clones ancestrales o clones de fundación como también se les denomina (Deren, 1995). Los resultados del presente trabajo confirman la incidencia de la limitación anterior en variedades de reciente recomendación para su explotación comercial y que forman parte del germoplasma cubano de este cultivo, lo cual había sido resaltado previamente mediante marcadores RFLPs por Coto *et al.*, (2002) para un grupo de clones ancestrales, y por Canales *et al.* (1999) para un grupo importante de variedades comerciales.

Estos métodos moleculares permitieron corroborar que las variedades comerciales actuales de caña de azúcar presentan baja variabilidad genómica entre ellas, no obstante provenir ellas de una primera generación de progenitores diferentes. Esta problemática ocurre también en otros países productores de caña de azúcar, como Australia, Barbados, Brasil e India, donde en ningún caso se demostró un agrupamiento o separación significativa del resto de los genotipos obtenidos en Cuba.

Cuadro 2. Análisis de los ejes principales E1, E2 y E3.

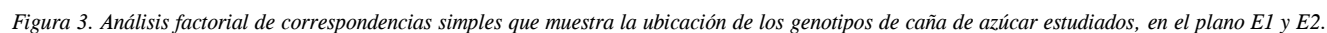
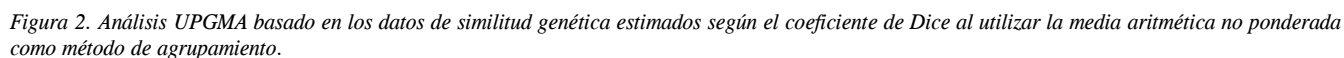
Componentes principales	% Varianza Total	% Acumulado
C1	9.48	9.48
C2	8.12	17.60
C3	5.91	23.51

Cuadro 3. Contribución de las bandas polimórficas a las ejes principales.

Bandas	E 1	E 2	E 3
A1	0.113	0.116	-0.680
A2	-0.423	0.074	-0.238
A3	-0.001	-0.050	0.025
A4	0.087	0.115	-0.139
A5	0.034	0.416	-0.027
A6	0.165	-0.141	0.238
A7	-0.042	0.710	-0.069
A8	-0.315	0.269	-0.079
A9	-0.084	0.357	0.365
A10	-0.116	-0.241	0.081
A11	0.692	-0.312	0.017
A12	0.280	-0.176	-0.286
A13	-0.429	0.069	0.101
A14	-0.175	0.187	0.008
A15	-0.709	-0.001	0.109
A16	-0.135	0.375	-0.238
A17	-0.293	-0.175	0.100
A18	-0.175	0.114	-0.480
A19	-0.191	-0.191	0.386
A20	-0.146	0.082	0.139
A21	0.165	-0.214	0.054
A22	-0.291	0.022	-0.017
A23	-0.189	-0.052	0.053
B1	0.019	0.143	0.182
B2	0.493	-0.153	0.299
B3	-0.410	0.274	-0.210
B4	0.264	-0.315	-0.447
B5	0.034	0.385	-0.118
B6	-0.063	-0.112	0.450
B7	0.433	0.394	0.025
B8	0.270	-0.128	-0.373
B9	-0.192	0.183	0.352
B10	-0.728	-0.425	-0.029
B11	0.728	0.425	0.029
B12	-0.342	-0.434	-0.499
B13	0.263	-0.181	0.156
B14	0.102	0.332	-0.059
B15	-0.295	0.686	-0.032
B16	-0.170	0.3688	0.144
B17	-0.221	-0.219	0.109
Expl.Var	3.792	3.249	2.363
Prp.Totl	0.094	0.081	0.059

Se propone hacer un análisis similar pero ampliando el número de individuos comerciales por países de origen. Este aspecto recobra vital importancia porque se evidencia que la base genética de *Saccharum* que origina a las variedades domésticas actuales, deberá ser renovada y enriquecida con el aporte de nuevas fuentes de variabilidad en los principales países productores de variedades de caña de azúcar (Raboin y D'Hont, 2003).

Varios centros de investigación en el mundo recientemente comenzaron a desarrollar varios tipos de marcadores moleculares para la identificación de variedades en un amplio rango de cultivos, que incluyen trigo (*Triticum*



sativum L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (Donini *et al.*, 2000), por lo que los resultados alcanzados en este trabajo significan un avance en el intento de automatizar y abaratar los costos en la identificación de variedades de caña de azúcar, si se tiene en cuenta que hasta el presente los principales descriptores de grupos de diversidad e individuales reportados en genotipos de caña se relacionan principalmente con marcadores RFLP (Cornide, 2000).

Esta cuestión también es de importancia como herramienta para procedimientos de protección legal, exportación e intercambio de germoplasma. Países productores de azúcar, como África del Sur, reportan el desarrollo de una base de datos para la identificación de variedades basados en secuencias de microsatélites y AFLP (Huckett *et al.*, (2002). Resultados previos reportados por Arencibia *et al.* (1999), constituyeron los primeros reportes de aplicación de este tipo de marcador en la identificación de plantas transgénicas en este cultivo. En este trabajo se reporta por primera vez, para el área Latinoamericana, la aplicación de estos marcadores en la identificación de variedades comerciales de caña de azúcar obtenidas mediante mejoramiento tradicional.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken K S, P A Jackson, C L McIntery (2005) A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theor. Appl. Gen.* 110:789-801.
- Al-Janabi S M, R J Honeycutt, M McClellan, B W S Sobral (1993) A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics* 134:1249-1260.
- Arencibia A, E Carmona, M T Cornide, S Castiglione, J O'Reilly, A Chinae, P Oramas, F Sala (1999) Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. *Transgenic Res.* 8:349-360.
- Benzecri J P. (1973) L'analyse des données. Tome II : L'analyse des correspondances. Dunod, París. 619 p.
- Carmona E, M Rodríguez, J Borroto, A Arencibia (2000) Somaclonal variation in transgenic sugarcane plants: Practical implications. *In: Plant Genetic Engineering Towards the Third Millennium.* A. Arencibia (ed). Elsevier Science. Amsterdam. pp:62-67.
- Carmona E, D Vargas, C Borroto, J Lopez, A Fernández, A Arencibia, O Borrás-Hidalgo (2004) cDNA-AFLP analysis of differential gene expression during sugarcane - *Puccinia melanocephala* interaction. *Plant Breed.* 123 (5):499-501.
- Cooke R, C Reeves (1998) Cultivar identification a review of new methods. *In: Encyclopedia of Seed Production of World Crops.* A Kelly, R George (eds). John Wiley and Sons, London. pp:88-102.
- Cornide M T, O Coto, D Calvo, E Canales, F De Prada, G Pérez (2000) Molecular markers for the identification and assisted management of genetic resources for sugarcane breeding. *Plant Var. Seeds* 13:113-123.
- Cornide M T (2000) Molecular characterization of the sugarcane variability for genetic improvement. *In: Plant Genetic Engineering towards the Third Millennium.* A Arencibia (ed). Elsevier Science. Amsterdam. pp:49-61.
- Coto O, M T Cornide, D Calvo, E Canales, A D'Hont, F de Prada (2002) Genetic diversity among wild sugarcane germoplasm from Laos revealed with molecular markers. *Euphytica* 123: 121-130.
- D'Hont A, P Rao, P Feldmann, L Grivet, N Islam-Faridi, P Taylor, J Glaszmann (1995) Identification and characterization of sugarcane intergeneric hybrids *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus* with molecular markers and DNA in situ hybridization. *Theor. Appl. Gen.* 91:320-326.
- Dellaporta L, J Wood, J Hicks (1983) A plant miniprep. *Version II.* *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Deren C W. (1995) Genetic base of mainland sugarcane. *Crop Sci.* 35:1195-1199.
- Donini P, R Cooke, C Reeves (2000) Molecular markers in variety and seed testing. *In: Plant Genetic Engineering Towards the Third Millennium.* A Arencibia (ed). Elsevier Science. Amsterdam. pp:27-34.
- Glasmann J C, A D'Hont (1999) Análisis molecular de la biodiversidad del germoplasma en caña de azúcar. *In: Biodiversidad y Biotecnología de la Caña de Azúcar.* A D Arencibia, M T Cornide (eds). Elfos Scientiae La Habana, Cuba.
- Grivet L, A D'Hont, D Roques, P Feldman, C Lanaud, J C Glasmann (1996) RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organisation in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142:987-1000.
- Hoarau J Y, B Offmann, A D'Hont, A M Risterucci, D Roques, J C Glasmann, L Grivet (2001) Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). 1. Genome mapping with AFLP markers. *Theor. Appl. Gen.* 103:84-97.
- Huckett B, D Carson, J Barnes, B Heinze, G Meyer (2002) Biotechnology Annual Report SASEX. South Africa. pp:21-26.
- Jorge H, R González, M Casas, I Jorge (2002) Normas y Procedimientos del Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar en Cuba. Boletín No. 1 Cuba & Caña. Publicina. Ciudad Habana. 315 p.
- Ming R, S C Liu, J E Bowers, P H Moore, J E Irvine, A H Paterson (2002) Construction of *Saccharum* consensus genetic maps from two interspecific crosses. *Crop Sci.* 42:570-583.
- Ming R, S C Liu, Y R Lin, J da Silva, W Wilson, D Braga, T F Wenslaff, K K Wu, P H Moore, W Burnquist W, M E Sorrells, J E Irving, A H Paterson (1998) Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: comparative organisation of closely related diploid and polyploidy genomes. *Genetics* 150:1663-1682.
- Mudge J, W R Anderson, R L Kehrer, D J Fairbank (1996) A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. *Crop Sci.* 36: 1362-1366.
- Pérez G, N Bernal, A Chinae, J O'Reilly, F de Prada (1997) Recursos genéticos de la caña de azúcar. Publicaciones Imago, Ciudad Habana. 249 p.
- Raboin LM, A D'Hont (2003) Sugarcane genome análisis at CIRAD. *In: Seminar Papers on Sugarcane Genomics and Genetic Transformation.* Vasantdada Sugar Institute. Pune, India. pp:1-5
- Rodríguez M, A Arencibia (2002) Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas. *In: Marcadores Moleculares Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección de las Plantas.* M T Cornide *et al.* (eds). Editorial Félix Varela. La Habana. Cuba. pp:13-35.
- Rossi A, P G Araujo, F Paulet, O Garsmeur, V M Dias, H Chen, M A Van Sluys, A D'Hont (2003) Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. *Mol. Gen. Genomics* 269:406-419.
- Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T Van de Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kuiper, Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.

Weising K, P Winter, B Huttel, G Kuhl (1998) Microsatellite markers for molecular breeding. J. Crop Prod. 1:113-142.