ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN CAÑA DE AZÚCAR USANDO MARCADORES RAPDs.

Karen E. Cedeño Castro[1], Raúl O. Castillo Torres[2].

[1]Escuela Superior Politécnica del Litoral; e-mail: kcedeno@espol.edu.ec, [2]Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar del Ecuador, e-mail: rcastillo@cincae.org

Resumen

Se caracterizaron molecularmente de 249 accesiones, que corresponden a la segunda mitad del Banco de Germoplasma del CINCAE, utilizando la técnica molecular AP-RAPDs. Esta técnica combina el uso de un iniciador arbitrario con la síntesis enzimática de múltiples copias de ADN. Veinte y nueve iniciadores de la serie OPERON Technologies generaron un total de 154 bandas polimórficas en un rango de 500-3900 pb. El número promedio de bandas amplificadas por iniciador es equivalente a 5.3 fragmentos/iniciador y el número de fragmentos polimórficos amplificados va de 3 a 10 por iniciador. El porcentaje de polimorfismo calculado en relación al número de bandas amplificadas y polimórficas es de 37.29%. Los Coeficientes de Similitud Genética fueron obtenidos por medio del programa NTSYSpc, opción Jaccard y a partir del método algorítmico UPGMA incluido en el programa se generó un dendograma, donde se identificaron 20 grupos distintivos y 33% de las variedades no se agruparon de manera definida. El promedio de similitud de los genotipos es del 65.5%. La variedad con mayor superficie cultivada en el Ecuador, Ragnar, se encuentra en el grupo 14, al igual que las variedades CP33-224 y CP52-43 reportadas en la literatura por su alto contenido de sacarosa.

Summary

A molecular characterization of 249 varieties corresponding to the second half of the Germoplasm bank of CINCAE was carried out using AP-RAPDs technique. The technique combines the use of arbitrary primers with the enzimatic synthesis of multiplex copies of DNA. Twenty nine decamer primers from OPERON Technologies generated a total of 154 polymorphic bands ranging from 500-3900 bp. The number of amplified products yielded an average of 5.31 fragments per primer, and the number of polymorphic DNA fragments generated ranged from 3 to 10. Polymorphism percentage calculated from total bands amplified with polymorphic bands was 37.29%. Genetic Similarity coefficients were obtained using NTSYSpc program, option Jaccard, and the UPGMA clustering algorithm generated a dendogram. There were 82 (33%) varieties/clones did not group clearly, but the majority of them formed 20 distinctive clusters. Average Genetic Similarity amongst genotypes was 65.5%. The most planted variety in Ecuador, Ragnar, was located in group 14 with 0.59 similarity coefficient together with CP33-224 and CP52-43 which are known to be high sucrose producers.

1. Introducción

La caña de azúcar es considerada uno de los cultivos más complejos genéticamente, puesto que presenta características citogenéticas excepcionales con relación a la mayoría de las plantas [15]. En este cultivo se encuentran fenómenos tales como poliploidía, aneuploidía, mosaicismo cromosómico, irregularidades meióticas, etc.[25,27].

Las principales especies del género *Saccharum, S. officinarum y S. spontaneum*, han contribuido a originar los actuales cultivares de caña de azúcar. *S. officinarum* es conocida por conferir altos contenidos de azúcar o como caña “noble” [3] y generalmente se caracteriza por tener un número cromosómico de 2n = 80 [21] y *S. spontaneum* que es una especie silvestre, con un amplio rango de número cromosómico de 2n = 40 a 128, contribuye a incrementar la resistencia a enfermedades, adaptabilidad y tolerancia a las condiciones de estrés [28,10,35,11,21]. Este cruzamiento natural ha dado como resultado complejos poliploides que contienen más de 100 cromosomas [19,18].

En el Ecuador, la caña de azúcar es uno de los cultivos más importantes, por el área sembrada y su importancia económica dentro de la industria en la producción de azúcar, alcohol y panela, actividad que genera trabajo para miles de ecuatorianos [24].

Según el III Censo Nacional Agropecuario efectuado en el año 2000, el Ecuador posee más de 85000 hectáreas de caña destinadas a la producción de azúcar y para otros usos [20]. Más del 75% del área sembrada son manejadas directamente por los ingenios azucareros San Carlos (23506 ha), La Trocal (22205 ha) y Valdez (18388 ha) [32,7].

Entre las variedades sembradas por los ingenios, la variedad Ragnar muestra una clara dominancia en los tres ingenios, con un 74% del total de la superficie cultivada; siendo CR74-250, CC85-92, PR67-1070, B7678 y C132-81las variedades que ocupan el porcentaje restante. De acuerdo con datos reportados en el Informe Anual del CINCAE [7], las variedades B7678, CR74-250 y CC85-92, han sido sembradas en superficies por encima de las 2000 ha dentro del total de área sembrada por el cultivo de caña de azúcar en el litoral ecuatoriano.

Como es evidente, la producción de la caña en la costa ecuatoriana depende de pocas variedades introducidas hace varios años al país, y el área que cubre cada variedad depende de los periodos de producción o los problemas de manejo que estas presenten. Por tal razón, el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE), mediante el Programa de Variedades ha priorizado la obtención de variedades nacionales y el estudio de variedades introducidas que forman el banco de germoplasma. Este banco debe ser caracterizado de manera morfológica y molecularmente, permitiendo conocer a los posibles padres o grupos de variedades que se cruzarán para obtener las mejores combinaciones genéticas y evaluar su descendencia en diferentes ambientes, con la finalidad de ofrecerle al país, nuevas variedades que reúnan mejores o iguales características que la variedad Ragnar, y así diversificar la producción [5,4].

La caracterización morfológica es complementada con la caracterización molecular, la misma que puede realizarse mediante el uso de técnicas basadas en ADN.

La tecnología más usada en la actualidad es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), desarrollada por Kary Mullis a mediados de la década de los 80 [26,31,36] causando una completa revolución en la Biología molecular, tanto en plantas como en animales. La ventaja de la PCR incluye el requerimiento de pequeñas cantidades de ADN, para obtener a partir de síntesis enzimática millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa y en el apareamiento y polimerización de oligonucléotidos utilizados como iniciadores ("primers") [36].

En 1990, iniciadores con secuencias arbitrarias y de máximo 10 nucleótidos, permitieron desarrollar la técnica denominada RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") [39,38], facilitando el análisis genómico de individuos y poblaciones. La técnica de RAPDs [16], involucra la amplificación o copia del ADN genómico al azar en presencia de iniciadores arbitrarios, es de fácil ejecución, costo reducido y aplicable a cualquier organismo. Sin embargo, existen problemas de repetibilidad de sus productos de amplificación, y una limitada información genética por locus, debido a sus marcadores dominantes [37,22].

Desde su descripción, el uso de marcadores RAPD en el análisis genético ha tenido una difusión extremadamente rápida. En el complejo *Saccharum* ha sido ampliamente aplicada a procesos de análisis de diversidad y filogenia [16,27,1], proporcionando invaluable información sobre diversidad genética y relación entre especies y, permitiendo alcanzar objetivos planteados en programas de mejoramiento, sobretodo en caña de azúcar [12,2,23].

La caracterización molecular de las accesiones del Banco de Germoplasma del CINCAE plantea los siguientes objetivos:

- Caracterizar molecularmente la variabilidad genética de 249 clones y variedades de caña de azúcar que corresponden a la segunda parte del Banco de Germoplasma del CINCAE,

- Establecer las diferencias y semejanzas entre las variedades/clones evaluadas para su uso posterior en cruzamientos.

2. Materiales Y Métodos.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar del Ecuador, CINCAE ubicado en el Km. 49.6 de la vía Durán-El Triunfo, a 02° 19´ 33´´ de Latitud Sur y 79° 26´ 83´´ de Longitud Oeste.

2.1. Material utilizado.

Las accesiones caracterizadas son 249 variedades y clones que corresponden a aproximadamente el 50% del Banco de Germoplasma del CINCAE. La procedencia y el número de variedades/clones es presentado en la Tabla I.

Tabla I. Procedencia de las Variedades/Clones que forman parte del ensayo.

Origen	Nombre	# de Variedades
Barbados	B	45
Canal Point, USA	CP	31
Valdéz-Canal Point, USA	VCP	24
Cuba	C	15
Puerto Rico	PR	13
Hawai, USA	H	11
Queensland, Australia	Q	9
Ecuador-Sao Paulo	ECSP	8
Sao Paulo, Brasil	SP	8
Lyallpur, Pakistan	L	6
Otros(India, Colombia, etc)		79
Total		249

2.2. Extracción de ADN.

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el protocolo de microextracción utilizando CTAB, descrito por Doyle y Doyle, (1990) modificando la cantidad de β-Mercaptoetanol hasta 8 µl por muestra [13].

La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó en geles de agarosa al 0.8% (P/V) en TBE buffer 1X, tomando como referencia al marcador de peso molecular DNA Low Mass Ladder (*Invitrogen, 10068-013*). Las muestras se migraron a 100V por 30 min y reveladas por medio del fotodocumentador *UVP Biodoc-It^{TM} and VisiDoc-It Systems* en presencia de luz ultravioleta, capturándose la imagen con extensión *jpg.*

2.3. Reacciones RAPD.

Las condiciones originales de Williams *et al*. (1990) [39] fueron adaptadas para optimizar un protocolo RAPD en caña de azúcar en el laboratorio de Marcadores Moleculares del CINCAE [14].

Para la amplificación del ADN genómico por medio de la reacción de AP-PCR se preparó 10 µL de mezcla de reacción, la misma que estaba formada por Tampón de PCR 1X, 3 mM de $MgCL_2$, 0.5mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 0.6 µM del iniciador y 1U de Taq polimerasa Recombinante (Invitrogen), más 20 ng de ADN.

El proceso de amplificación fue llevado a cabo en el Termociclador TECHNE, bajo las siguientes condiciones de amplificación: Ciclo inicial de desnaturalización a 92 º C por 4 min, 40 ciclos de amplificación con desnaturalización cíclica a 92 º C por 1 min, la hibridación de acuerdo a la temperatura óptima del iniciador por 1 min, 2 min de elongación cíclica a 72 ºC, y un ciclo de extensión final a 72 ºC por 7 min.

2.4. Iniciadores ("PRIMERS").

Un total de 29 iniciadores de la serie OP (Operon Technologies Inc.) fueron empleados para las reacciones de AP-RAPD, seleccionados por el número y consistencia de fragmentos amplificados en la caracterización de la primera parte del Banco de Germoplasma [14].

2.5. Separación de Productos RAPDs.

Los productos RAPD fueron separados en geles de agarosa preparados al 1.5% (P/V) en buffer TBE 1X mediante electroforesis horizontal, utilizando un marcador de referencia (1 Kb DNA *Ladder Marker*). La electroforesis se efectuó a 120 V durante 2 horas y 20 min.

Para la visualización de los fragmentos amplificados los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (0.5 mg/mL). La imagen de los patrones RAPDs se capturaron bajo luz ultravioleta con una longitud de onda de 300 nm.

2.6. Análisis de Polimorfismos de RAPDs.

Los perfiles RAPD obtenidos fueron analizados mediante la cuidadosa inspección visual de los geles tomando como referencia a los patrones evaluados en la caracterización de la primera parte de la colección, originando una matriz de datos binarios, donde 1 indica presencia y 0 ausencia de la banda amplificada.

Para los análisis de similitud se utilizó el programa de NTSYSpc 2.01c (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) [29], con el fin de establecer relaciones entre las OTUs seleccionando al coeficiente de Jaccard [9].

Para representar las relaciones taxonómicas entre las OTUs en un espacio bidimensional se utilizaron dendrogramas, construidos por el método de ligamiento no ponderado promedio UPGMA [34].

3. Resultados y Discusión

3.1. Extracción de ADN genómico de Caña de Azúcar.

Se obtuvo ADN de buena calidad y cantidad, en concentraciones entre 20 a 60 ng/ul, permitiendo aseguran la integridad del ADN para los procesos de amplificación al azar de bandas polimórficas.

3.2. Reacciones RAPDs.

3.2.1. Bandas polimórficas generadas.

Los 29 iniciadores evaluados generaron un total de 413 bandas amplificadas de las cuales 154 son polimórficas, con un rango de peso molecular de 500-3900 pares de bases. El número de bandas polimórficas generadas es de 3-10 por iniciador, con un promedio general de 5.3 bandas/iniciador. Este número de bandas polimórficas promedio por iniciador y peso molecular son similares a los reportados por Nair et al (1999), donde se obtuvieron de 2 a 11 bandas polimórficas con un peso molecular entre 360-3770 pb, utilizando 12 iniciadores con 9 clones de caña de azúcar [27].

3.2.2. Primers polimórficos.

Los primers que generaron mayor número de bandas polimórficas corresponden a OPA-17(8), OPA-19(8), OPB-01(8), OPB11(10), y OPU-17(9), coincidiendo con los datos generados con estos mismos primers en análisis de diversidad genética [1] y detección de cambios genéticos en cultivo de tejidos [16].

Los primers que generaron un mayor número de bandas de acuerdo al total generado por primer son: OPA-19, OPB-11, OPC-14, OPE-01; con más de 47 % de bandas polimórficas del total amplificado. Es interesante destacar que el primer OPE-01, ha sido utilizado recientemente en mapeo de loci cualitativos relacionados con el contenido de azúcar y análisis de segregación, generando 2 bandas de alto interés [33].

En la Tabla II se exponen las secuencias y peso de las bandas polimórficas amplificadas de los iniciadores más polimórficos.

Tabla II. Primers más Polimórficos de acuerdo a la relación entre Bandas Amplificadas y Bandas Polimórficas

Primer	Secuencia	Peso de Bandas (pb)
OPA-17	GACCGCTTGT	520-2030
OPA-19	CAAACGTCGG	517-3900
OPB-01	GTTTCGCTCC	520-1400
OPB-11	GTAGACCCGT	506-1900
OPC-14	TGCGTGCTTG	650-1020
OPE-01	CCCAAGGTCC	900-3000
OPU-17	ACCTGGGGAG	600-2800

3.2.3. Porcentaje de Polimorfismo.

El ratio de polimorfismo encontrado de acuerdo al número de bandas amplificados con relación a las bandas polimórficas es de 37.29%, cercano al valor obtenido por Gómez, [14] donde al caracterizar 220 variedades correspondientes a la primera parte de la colección del CINCAE se obtuvo un 39.13% de polimorfismo [14]. Además el porcentaje de polimorfismo encontrado supera el 28.58% determinado por Afghan en relación a la detección de diversidad genética en 10 genotipos correspondientes a somaclones y parentales [1].

3.2.4. Análisis de Polimorfismos RAPDs.

Por medio del software NTSYS PC opción Jaccard como coeficiente de similitud y utilizando el método algorítmico de agrupamiento no ponderado UPGMA, se construyó un dendograma a partir de la base de datos de doble estado (Presencia/Ausencia) generada del registro de las bandas polimórficas por primer (Figura 1).

El coeficiente de similitud utilizado para identificar los grupos fue 0.57, permitiendo establecer 20 grupos y 33.3% de las variedades no agrupadas claramente.

Tomando en cuenta las características citogenéticas de la caña de azúcar como es su poliploidía, aneuploidia, mosaisismo cromosómico, entre otras; es de esperar que los grupos formados no mantengan relaciones estrechas entre los individuos que los conforman. Sin embargo, podemos observar que ciertos grupos presentan concentración de genotipos de acuerdo a su origen, en el Grupo 2 se encuentran 19 individuos procedentes de Barbados; en el Grupo 3 individuos procedentes de Cuba y, en los Grupos 7, 8, 14 y 19 individuos originarios de Canal Point (Estados Unidos).

La variedad PR1059, se encuentra presente en Grupo 1 al igual que el clon ECSP98-169 y 2 variedades procedentes de Barbados B37161 y B74127, todos con diferente origen y parentales, pero reportados como resistentes a Gomosis, SCMV (Mosaico) y LSC (Escaldadura de la hoja) y susceptibles a Pokkah Boeing [30].

El grupo conformado por el mayor número de individuos es el Grupo 4, conteniendo variedades de diferente origen; sin embargo, 4 de esos individuos coinciden con POJ2878 como su parental femenino y 1 individuo como su parental masculino. Además, en este grupo encontramos concentrado 8 accesiones procedentes del Ingenio Valdez e identificadas como VCP.

Es interesante apreciar que el Grupo 13 se encuentra formado por variedades Sao Paulo (Brasil) y clones ECSP (CINCAE) obtenidos a partir de cruzamientos entre variedades procedentes de Sao Paulo, lo que indica su cercanía genética.

El Grupo 14 incluye a Ragnar agrupada con variedades de diferente procedencia, pero reportados en la literatura con alto contenido de azúcar y por ser considerados buenos parentales [7].

Adicionalmente se encuentran tres variedades agrupadas en la parte superior del dendograma con un coeficiente de similitud de 0.52, dos de ellas corresponden a Barbados y la otra variedad se encuentra identificada con código numérico lo que podría indicar que la nomenclatura de su identificación sea incorrecta.

3.2.5. Promedio de Similitud.

El promedio de similitud obtenido entre las variedades en estudio es igual al 65.5%, muy cercano al valor obtenido por Cerón y Ángel (2001) donde al analizar 18 variedades de alta importancia económica se obtuvo 69% como promedio de similitud [6]; sin embargo, es menor al determinado por Afghan et al., donde el promedio fue de 78.96% entre los somaclones y parentales [1].

3.2.6. Identificación de Duplicados.

Como parte de las variedades en estudio se tenían accesiones con nombres repetidos y los cuales se debían identificar si eran duplicados o accesiones con nombres incorrectos, es así que, se obtuvieron porcentajes de similitud del 63 al 100% entre estas variedades.

Los coeficientes de similitud determinados entre las accesiones son: B74418a y B74418b con un 63%; CP52-68a y CP52-68b con similitud del 92%; L72-3a y L72-3b con el 98%; al igual que Mex69-290a y Mex69-290b; y, CC84-75a con CC84-75b, con una cercanía genética del 100%.

Estas accesiones fueron evaluadas morfológicamente en campo. Los descriptores morfológicos usados por Martínez y Romero [24], para caracterizar la primera parte de la colección del CINCAE, corroboran la información molecular con la morfológica [24]. Se tomaron las características más predominantes al momento de la evaluación, coincidiendo morfológicamente 4 pares de duplicados: CC-8475, CP-5268, L-72-3 y Mex-69290.

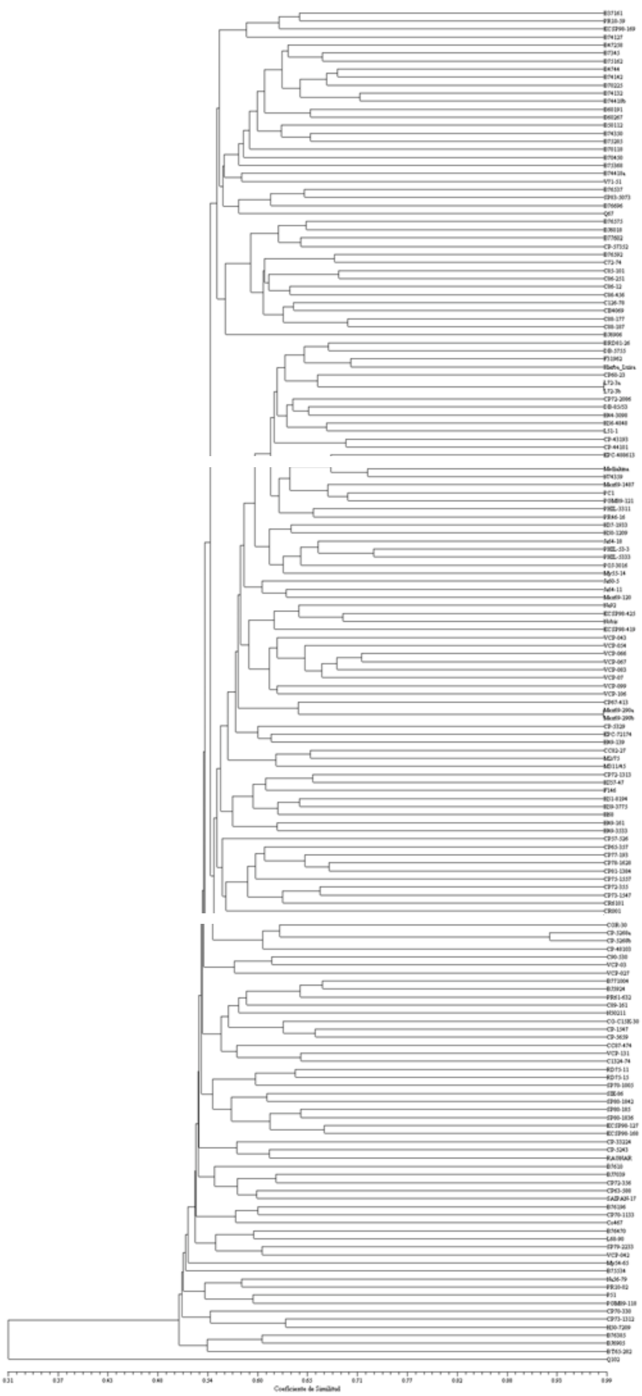

Figura 1. Dendograma mostrando la similitud de 167 variedades/clones, elaborado utilizando el método algorítmico UPGMA incluido en el software NTSYSpc. CINCAE, 2006.

4. Conclusiones

Los primers con los que cuenta el Laboratorio de Marcadores moleculares del CINCAE genera bandas polimórficas de alta resolución entre 500-3900 pares de bases, con un promedio de 5.3 bandas por primer, concluyendo que son eficientes para determinar polimorfismo por primer y entre accesiones.

Los iniciadores con más alto polimorfismo son: OPA-17, OPA-19, OPB-01, OPB11, OPC-14, OPE-01 y OPU-17.

El porcentaje de polimorfismo determinado entre los 249 variedades es del 37.29% lo que indica una relativa variabilidad genética entre las accesiones.

Se determinaron 20 grupos representativos y 33.3% de las variedades no agrupadas claramente, con un coeficiente de similitud de 0.57 y subgrupos a 0.60 de similitud.

El dendograma generado a partir de la matriz de similitud entre las accesiones muestra relación en los Grupos por origen, tomando como ejemplo al Grupo 2, que muestra concentración de accesiones provenientes de Barbados; agrupación por contenido de azúcar, como en el Grupo 14; y agrupadas por resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades como en el Grupo 1.

El promedio de similitud encontrado entre las variedades es del 65.5%, obtenido por la cercanía genética entre 4 pares de accesiones y el OTU aislado con un coeficiente de 0.31.

Se estableció que el porcentaje de similitud para considerar a un par de accesiones como duplicado se encuentra entre el 92-100%, y corroborando los datos moleculares con los morfológicos, se concluye que las variedades identificadas como B74418a y B74418b, con un 63% de similitud son accesiones con nombres incorrectos y no corresponden a la misma variedad.

Los genotipos CP52-68a y CP52-68b, con similitud del 92%; L72-3a y L72-3b, con el 98%; al igual que Mex69-290a y Mex69-290b y, CC84-75a con CC84-75b que presentan una cercanía genética del 100%, corresponden a la misma variedad y se encuentran duplicados en el Banco de Germoplasma.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la metodología RAPD permitió analizar la variabilidad genética de la segunda parte del Banco de Germoplasma del

CINCAE y además diferenciar duplicados y accesiones con nombres incorrectos.

5. Agradecimiento

La autora principal del presente trabajo de investigación expone de manera formal un profundo agradecimiento a su director de tesis y vocales por el apoyo brindado durante el desarrollo del mismo. Al CINCAE, por haberle permitido el uso de las instalaciones, equipos y materiales; al personal técnico y administrativo por su colaboración. Pero sobretodo, a sus padres y hermana por su valiosa motivación para la culminación de este proyecto de investigación.

6. Referencias

1. AFGHAN, S.; SALEEM HAIDER, M.; HUSSAIN SHAH, A.; RASHID, N.; IQBAL, J.; AKHTAR, M. 2005. Detection of genetic diversity among sugarcane (*Saccharum sp.*) genotypes using Ramdom Amplified Polymorphic DNA markers. Sugar Cane International 23(6): 15-19.
2. AL JANABI, S.; McCLELLAND, M.; PETERSEN, C.; SOBRAL, B. 1994. Phylogenetic análisis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: Saccharinae. Theor. Appl. Genet. 88: 993-944.
3. BREMER, G. 1961. Problems in breeding and cytology of sugar cane, 2. The sugar cane breeding from a cytological viewpoint. Euphytica 10: 59-243.
4. CASTILLO. 2003. Variedades de Caña de Azúcar en Ecuador. En: El Cultivo de la Caña de Azúcar en el Ecuador. Guayaquil, EC. AETA. p. 14-30.
5. CASTILLO ; SILVA, E. 2004. Fisiología, floración y mejoramiento genético de la caña de azúcar en Ecuador. El Triunfo, EC. CINCAE. 26 p. (Publicación Técnica no. 6)
6. CERÓN, A.; ÁNGEL, F. 2001. Genetic diversity in sugarcane hybrids breeding in Colombia measured using molecular markers. Sugar Cane Technol. 24: 626-629.
7. CINCAE (Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar del Ecuador). 2005. Informe Anual. El Triunfo, EC. CINCAE. 45 p.
8. COPERSUCAR (Cooperativa Central dos Productores de Acúcar e Álcool do Estado de Sao Paulo). 1979. Variety Notes. 3rd revision. Sao Paulo, BR. COPERSUCAR. 50 p.
9. CRISCI, J.; LÓPEZ, M. 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Washington DC., US. OEA. 128 p. (Serie de Biología no. 26).
10. DANIELS, J.; SMITH, P.; PARTON, N.; WILLIAMS, C. 1975. The origin of the genus Saccharum. Sugarcane Breed Newsett 36: 24-39.
11. D´HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. 1996. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular cytogenetics. Mol. Gen. Genet. 250: 405-413.
12. D´HONT, A.; LU, Y.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J. 1993. Cytoplasmatic diversity in sugarcane revealed by heterologous probes. Sugar Cane 1: 12-15.
13. DOYLE, J.; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tissue. BRL Focus 12: 13-15.
14. GÓMEZ, A. 2005. Caracterización molecular de 220 variedades de caña de azúcar de la colección universal del CINCAE. Tesis Mag. Sc. Guayaquil, EC. Universidad de Guayaquil. 49 p.
15. GRIVET, L.; D´HONT, A.; DUFOUR, P.; HAMON, P.; ROQUES, D. 1994. Comparative genome mapping of sugarcane with others species within the Andropogoneae tribe. Heredity 73: 500-508.
16. HARVEY, M.; BOTHA, F. 1996. Preliminary genomic mapping and phenotypic assessment of a commercial sugarcane cross (AA40). Sugarcane: Research Towards Efficient and Sustainable Production p. 64-66.
17. ___________ ; BOTHA, F. 1996. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. Euphytica 89: 257-265.
18. ___________ ; CARSON, D.; GROENEWALD, S.; HUCKETT, B.; MSOMI, N.; BOTHA, F. 1996.

Application of the PCR-RAPD methodology to sugarcane breeding at the South African Sugar Association Experiment Station. Sugarcane: Research Towards Efficient and Sustainable Production p. 67-69.
19. HEINZ, D. 1987. Sugarcane improvement: current productivity and future opportunities. In Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop. Sao Paulo, Brasil. COPERSUCAR. p. 57-70.
20. INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de Ecuador). 2003. Resultados III Censo Nacional Agropecuario (en línea). Ecuador. Consultado 27 ago. 2005. Disponible en http://www.inec.gov.ec/
21. JANNOO, N.; GRIVET, L.; SEGUIN, M.; PAULET, F.; DOMAINGUE, R.; RAO, P.; DOOKUN, A.; D' HONT, A.; GLASZMANN, J. 1999. Molecular Investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. Theory Applied Genetic 99: 171-184.
22. KESSELI, R.; PARAN, I.; MICHELMORE, R. 1992. Efficient Mapping of Specifically Targeted Genomic Regions and the Tagging of These Regions with Reliable PCR-based Genetic Markers. *In* Nienhuis, J. (ed.). Applications of RAPDs Technology to Plant Breeding, American Society of Horticultural Science. Madison, US. p. 31-36.
23. LU, Y.; D´HONT, A.; WALKER, D.; RAO, P.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J. 1994. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. Euphytica 78: 7-18.
24. MARTÍNEZ, F.; ROMERO, H. 2004. Caracterización de 220 variedades de caña de azúcar *Saccharum officinarum* usando descriptores morfológicos y agronómicos. Tesis Ing. Agron. Milagro, EC. Universidad Agraria del Ecuador. 128 p.
25. MOORE, P.; IRVINE, J. 1991. Genomic mapping of sugarcane and its potential contribution to improvement and to selection of new varieties. Proc. South African Sugar Technol. Assoc. p. 96-102.
26. MULLIS, K.; FLACOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase catalysed chain reaction. Methods Enzymol. 55: 335-350.
27. NAIR, V.; NAIR, S.; SREENIVASAN, T.; MOHAN, M. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in Saccharum and related genera using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution 46: 73-79.
28. ROACH, B. 1972. Nobilisation of sugarcane. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.14: 206-216.
29. ROHLF, F. 1992. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.0. User guide. New York, US. Exeter Software. 60 p.
30. ROSSI, G. 2001. Sugarcane Variety Notes. 7th revision. Piracicaba, BR. 132 p.
31. SAIKI, R.; SCHARF, S.; MULLIS, K.; HORN, G.; ERLICH, H.; ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.
32. SICA (Servicio de información agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador). 2002. Superficie de caña cultivada y cosechada, producción de caña y azúcar, rendimientos en campo y fábrica (en línea). Ecuador. Consultado 24 ago. 2005. Disponible en http://www.sica. org.ec
33. SINGH, R.; SINGH, P.; SINGH, S.; MOHAPATRA, T.; SINGH, S. 2006. Mapping QTLs for sugar content and segregation analysis in sugarcane. Sugar Cane International 24(1): 7-13, 25.
34. SNEATH, P.; SOKAL, R. 1973. Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, US. W. H. Freeman. 574 p.
35. SREENIVASAN, T.; AHLOOWALIA, B.; HEINZ, D. 1987. Cytogenetics. In Heinz, D. ed. Sugarcane improvement through breeding. New York, US. Elsevier. p. 211-253.
36. TAYLOR, P.; GEIJSKES, J.; KO, H.; FRASER, T.; HENRY, R.; BIRCH, R. 1995. Sensivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. Theor. Appl. Genet. 90: 1169-1173.
37. TEXEIRA, C. 2001. Técnicas moleculares aplicadas al mejoramiento de milho (en

línea). Consultado 24 ago. 2005. Disponible en http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/resumos/claudiateixeira.htm

38. WELSH, J; McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18: 7213-7218.

39. WILLIAMS, G; KUBELIK, A; LIVAK, K; RAFALSKI, J; TINGEY, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18(22): 6531-6535.