

Diversidad genética en germoplasma de *Saccharum* spp mediante el uso de marcadores ISSR

Cindy Latorre¹, Ramón Rea¹, Daynet Sosa¹, Sandy Molina¹, Jhonny Demey¹, Rosaura Briceño² y Orlando De Sousa²

¹Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas, Venezuela.

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Venezuela.

ramonrea@hotmail.com

Resumen

El conocimiento de la diversidad genética existente en el germoplasma de caña de azúcar permite planificar cruces más efectivos con el propósito de producir nuevos cultivares. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética, mediante la utilización de marcadores moleculares intermicrosatélites (ISSR), en una muestra de 62 genotipos obtenido del banco de germoplasma de caña de azúcar del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Se evaluaron cinco cebadores que generaron 156 bandas polimórficas en un rango de 240 y 3430 pb. El Análisis de Coordenadas Principales (ACOP) ubicó a los genotipos en tres grupos, con una similitud genética media de $0,46 \pm 0,0046$; $0,42 \pm 0,0061$ y $0,46 \pm 0,0085$, respectivamente. Los resultados obtenidos permiten sugerir que los genotipos con caracteres agronómicos deseables de un grupo distante del otro pudieran ser dirigidos en cruces con la intención de generar más variabilidad genética.

Palabras clave: ISSR, similitud genética, marcadores moleculares.

Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm *Saccharum spp* Using ISSR Markers

Abstract

Knowledge of the existing genetic diversity in sugarcane germplasm permits planning more effective crosses to achieve new cultivars. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity in a sample of 62 genotypes obtained from the sugarcane germplasm bank at the National Agriculture Research Institute (INIA) using inter-microsatellital molecular markers (ISSR). Five initiators were evaluated that generated 156 polymorphic bands in a range of 240 and 3430 pb. Principal Coordinates Analysis (ACOP) ranked the genotypes into three groups, with a mean genetic similarity of 0.46 ± 0.0046 , 0.42 and $0.46 \pm 0.0061 \pm 0.0085$, respectively. Genetic diversity among the groups was low, however. Results suggest that genotypes with desirable agronomic traits in a group distant from another could be directed in crosses with the aim of generating more genetic variability.

Keywords: ISSR, genetic similarity, molecular markers.

Introducción

En Venezuela, la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido) es un rubro tradicional, se cultiva en el país desde tiempos coloniales. Actualmente, la superficie de siembra de caña para la elaboración de azúcar abarca un área próxima a las 119.000 hectáreas de las que se obtiene la biomasa suficiente para producir cerca de 550 mil toneladas de azúcar; esto representa alrededor del 40% del consumo nacional, haciendo que el déficit deba importarse [15]. Recientemente, la caña de azúcar ha ganado importancia en la producción de biocombustibles y en la alimentación animal. Una de las principales necesidades del sector azucarero es la selección de cultivares que produzcan mayores niveles de rendimiento en caña y azúcar por unidad de área [28]. Generalmente, los genotipos utilizados como progenitores en los programas de mejoramiento genético son caracterizados e identificados mediante marcadores morfológicos y agronómicos. Los marcadores moleculares tienen un gran potencial para mejorar la precisión de los cruzamientos en las campañas anuales de hibridación.

La variación del genoma de la caña de azúcar ha sido estimada utilizando diferentes marcadores moleculares tales como: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) [7, 9, 20, 31], microsatélites [5, 25, 26, 27], AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) [1, 8, 18, 23,

31] e ISSR [2, 13, 14, 20, 34, 37]. A pesar de estas nuevas facilidades para acceder al genoma de la caña de azúcar, el mejoramiento del cultivo en Venezuela se ha hecho tradicionalmente mediante la producción de híbridos, cuyos parentales solo han sido caracterizados a nivel morfológico y agronómico y no a nivel de ADN. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética existente en una muestra de progenitores del banco de germoplasma de caña de azúcar utilizados en el proceso de hibridación en Venezuela, mediante el uso de marcadores intermicrosatélites (ISSR).

Materiales y métodos

Material vegetal y extracción de ADN

Se seleccionaron 62 progenitores del banco de germoplasma del programa de mejoramiento genético de caña de azúcar del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Yaritagua, estado Yaracuy (Tabla 1). Para la extracción de ADN se utilizó el Plant DNeasy Mini Kit™ Qiagen®. El ADN obtenido fue almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

La concentración y calidad de los ADN extraídos de hojas jóvenes fue determinada mediante electroforesis (80 Voltios durante 50 minutos) en geles de agarosa al 1%, teñidos con Syber® Green (Promega, USA), y compara-

Tabla 1. Genotipos o progenitores de caña de azúcar de acuerdo a su procedencia.

| Cultivar | Lugar de procedencia | Cultivar | Lugar de Procedencia | |
|-----------|----------------------|------------|----------------------|-------------------------|
| B66-130 | Barbados | CP72-2086 | USA | |
| B67-49 | | CP74-2047 | | |
| B74-118 | | CP75-1082 | | |
| B75-403 | | CP81-1384 | | |
| B80-408 | | CR74250 | | República Dominicana |
| B81-219 | | G107 | | Híbrido interespecífico |
| B81-509 | | IAC82-3092 | | Brasil |
| B82-11 | | IAC86-2210 | | |
| C323-68 | Cuba | L62-96 | USA | |
| C266-70 | | LCP82-89 | | |
| C137-81 | | LCP85-384 | | |
| C86-503 | | POJ2878 | | Indonesia |
| C88-382 | | PR61-632 | | Puerto Rico |
| CC85-92 | Colombia | V60-4 | | |
| CB40-53 | Brasil. | V71-4 | | |
| MZC7425 | Colombia | V71-39 | | |
| NCo 310 | Sur África | V71-68 | | |
| RB835087 | Brasil | V75-5 | Venezuela | |
| RB855035 | | V78-1 | | |
| SP70-1284 | | V84-8 | | |
| SP71-1406 | | V92-5 | | |
| SP71-5574 | | V98-62 | | |
| SP71-6163 | Brasil. Sao Paulo | V98-76 | Venezuela | |
| SP72-4928 | | V98-80 | | |
| SP79-1011 | | V98-95 | | |
| SP80-1816 | | V98-120 | | |
| CP31588 | | | | V98-169 |
| CP52-68 | USA. Canal Point | V99-236 | | |
| CP67412 | | V99-245 | | |
| CP701527 | | V00-50 | | |
| CP721210 | | V02-47 | | |

dos con un marcador de peso molecular Lambda (λ) a una concentración de 100ng/ μ L.

Amplificación de regiones intermicrosatélites (ISSR)

Se probaron 11 cebadores, correspondientes al set #9 de la University of British Columbia Biotechnology Laboratory (U.B.C.B.L.). Sus secuencias se describen en la Tabla 2.

La mezcla de reacción se realizó a un volumen final de 20 μ L, conformada por tampón de PCR 1X, 0,2Mm dNTPs, 0,5mM del iniciador, 1U de Taq Polimerasa, 1ng

de ADN. Las concentraciones de MgCl₂ fueron estandarizadas de acuerdo a los requerimientos de cada iniciador. La variación en la concentración de este reactivo incide en la nitidez de las bandas amplificadas. Las concentraciones óptimas de este reactivo fueron 3mM; 3,5mM y 4mM dependiendo del iniciador.

La amplificación por PCR se inició con una desnaturación a 94°C durante cinco minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, un minuto a la temperatura de alineamiento correspondiente a cada iniciador varian-

Tabla 2. Lista de los cebadores tipo ISSR seleccionados para la amplificación de ADN de progenitores de caña de azúcar.

| Cebadores | Secuencia (5'-3') |
|-----------|---------------------------|
| 812 | GAG AGA GAG AGA GAG AA |
| 817 | CAC ACA CAC ACA CAC AA |
| 834 | AGA GAG AGA GAG AGA GCT |
| 850 | GTG TGT GTG TGT GTG TCT C |
| 858 | TGT GTG TGT GTG TGT GRT |
| 864 | ATG ATGATGATGATGATG |
| 878 | GGA TGG ATG GAT GGA |
| 885 | BHB GAGA GAGAGAGA GA |
| 888 | BDB CAC ACA CAC ACA CA |
| 890 | VHV GTG TGT GTG TGT GT |
| 891 | HVH TGTG TGTGTGTGTGTG |

do de 50 a 55°C y dos minutos a 72°C durante, y finalmente una extensión a 72°C durante siete minutos.

Los productos obtenidos de la amplificación con marcadores ISSR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y comparados con el marcador de peso molecular 1Kb-Plus con vistas a estimar el peso molecular de los fragmentos amplificados. La electroforesis se realizó en buffer TBE 1X durante 3h a 80 Voltios. El gel fue leído en un escáner Typhoon.

Técnicas de análisis y procesamiento de datos

Los fragmentos de amplificación obtenidos (bandas) fueron codificados de acuerdo a un marcador dominante, es decir, A1A1=A1A2=1 (banda presente) y A2A2=0 (banda ausente), generando una columna por locus para cada iniciador en una matriz de datos. El nivel de polimorfismo y la capacidad discriminadora de cada iniciador se valoró a través del contenido de información polimórfica (PIC) y la probabilidad de obtener parejas idénticas de alelos entre las muestras estudiadas [3, 12]. La relación genética entre los 62 progenitores se estudió aplicando la metodología propuesta por Demey *et al.* [11] que plantea el uso combinado del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), sobre datos de disimilitud utilizando los coeficientes de Jaccard, Emparejamiento simple, Dice y Rogers y Tanimoto [33]. El número k de dimensiones a ser retenidas, el coeficiente de similitud que mejor defina la estructura de los datos y las medidas de la calidad, fueron calculados también utilizando los procedimientos descritos por Demey *et al.* [11]. Para el cálculo de la capacidad informativa y discriminadora de los cebadores se utilizó el software Info-Gen, 2011p.

Resultados y discusión

Análisis de la variabilidad para ISSR

De los 11 cebadores analizados, se rechazaron i) aquellos que no amplificaron o no proporcionaron un patrón claro de amplificación y ii) los que proporcionaron polimorfismos poco consistentes. Sólo con cinco de ellos se obtuvo un polimorfismo claro y repetible, después de haber estandarizado las temperaturas de alineamiento óptimas (Tabla 3).

Los cinco cebadores ISSR generaron patrones de bandas que revelaron diferentes niveles de polimorfismo entre los 62 genotipos de caña de azúcar (Figura 1). Se obtuvieron 156 bandas, todas polimórficas (100%), con una media de 31 bandas polimórficas por iniciador; resultados similares encontraron Wang *et al.* [36], al obtener 100% de polimorfismo con el empleo de siete cebadores; y Fahmy *et al.* [14] con el empleo de tres marcadores ISSR. Otros autores han encontrado menor polimorfismo con el empleo de estos en caña de azúcar; sin embargo, los valores siempre han sido elevados, por ejemplo 82.8% [31], 84.13% [20], 88.8% [14], 78.48% [34], 94.9% [10], 95% [2] y 96,54% [13]. Este elevado nivel de polimorfismo es esperable teniendo en cuenta i) la naturaleza poliploide y heterocigota de la caña de azúcar, atribuida a las hibridaciones interespecíficas que originaron a los actuales genotipos; y ii) la misma naturaleza de los ISSR, cuyas dianas son regiones especialmente ricas en microsatélites; y se sabe que las mismas presentan una de las más altas tasas de mutación observadas en marcadores moleculares [16].

El tamaño de los fragmentos de ADN amplificados osciló entre 240 y 3430 pares de bases (pb) (Tabla 4). Valores similares a los obtenidos, han descrito otros autores para caña de azúcar: 400 a 2500pb [37], 394 a 2477 pb [31], 178 a 1556pb [34], 300 a 2000pb [2], 200pb a 2000pb [10], 200 a 2.0 kb [13].

El Contenido de Información Polimórfica (PIC) es utilizado para evaluar la capacidad discriminadora de los loci. Este varía entre 0 y 1, indicando un mayor nivel de polimorfismo o variación cuando el valor es más cercano a 1 [4, 35]. Los resultados obtenidos indican que los cebadores utilizados son medianamente informativos porque ninguno supera el intervalo teórico del 50%. Sin embargo, respecto a esta medida, encontramos valores entre 0,26 (iniciador 864) y 0,30 (iniciador 885) (Tabla 4), similares a los encontrados por otros autores [13, 20]. La capacidad discriminadora evaluada a través la probabilidad de que dos aislados diferentes tengan igual identidad, muestra que los cebadores con mayor PIC tienen mayor capacidad discrimi-

Tabla 3. Temperaturas de alineamiento óptimas para los cebadores ISSR.

| Cebadores | Secuencia (5'-3') | Temp. Alineamiento |
|-----------|-------------------------|--------------------|
| 864 | ATG ATG ATG ATG ATG ATG | 53°C |
| 885 | BHB GAGA GAGAGAGA GA | 53°C |
| 888 | BDB CAC ACA CAC ACA CA | 51,2°C |
| 890 | VHV GTG TGT GTG TGT GT | 53°C |
| 891 | HVH TGTG TGTG TGTG TGTG | 53°C |

minatoria (888 y 885) lo cual señala el valor potencial de estos dos cebadores para un uso futuro en la caracterización molecular de otros genotipos.

Si tomamos en cuenta que los microsatélites constituyen el marcador con más alto contenido de información polimórfica (PIC) dentro de los genomas de los eucariontes y en sentido particular, dentro de *Saccharum* [6, 24, 32], consideramos que posiblemente, explorando el genoma de estos genotipos con un número mayor de marcadores ISSR, se obtengan probablemente valores mayores; como los obtenidos por Zhang y col. [37]. (PIC de 0,667) con el

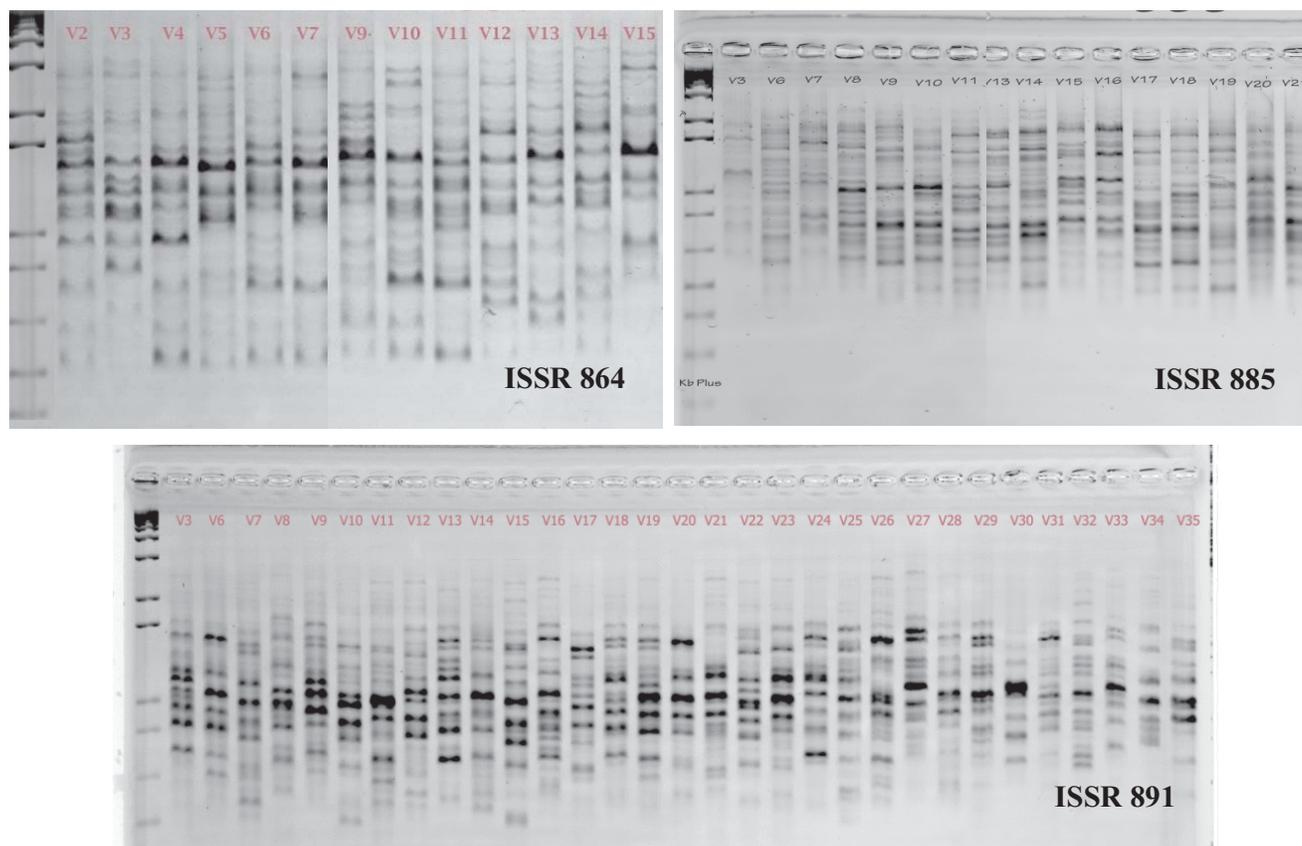


Figura 1. Patrones de bandas obtenidos con los diferentes cebadores ISSR.

Tabla 4. Polimorfismo y Capacidad discriminatoria de los cebadores ISSR en caña de azúcar.

| Cebador ISSR | Secuencia | Rango de Amplificación (pb) | Fragmentos amplificados y polimórficos | PIC |
|--------------|----------------------|-----------------------------|--|------|
| 864 | ATGATGATGATGATG ATG | 435-3430 | 37 | 0,26 |
| 885 | BHBGAGAGAGAGAGA GA | 520-2680 | 31 | 0,30 |
| 888 | BDBCACACACACACA CA | 470-1820 | 34 | 0,29 |
| 890 | VHV GTGTGTGTG TGT GT | 240-1160 | 25 | 0,27 |
| 891 | HVHTGTGTGTGTGTGTG | 410-1620 | 29 | 0,29 |
| Total | | | 156 | |

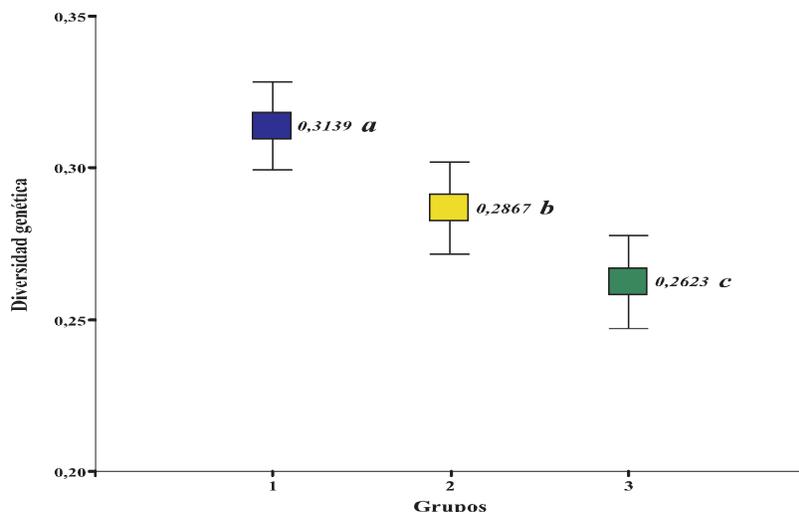


Figura 3. Diversidad genética entre los grupos evaluada con marcadores ISSR. ■ Grupo 1, ▲ Grupo 2 y ● Grupo 3.

tos datos coinciden con lo encontrado por Khan *et al.* [22] respecto a que la diversidad genética entre clones de caña de azúcar utilizada en mejoramiento genético es baja. Por lo tanto, la selección adecuada de los progenitores que proporcionen la mayor diversidad genética para caracteres deseados, asegura en gran medida el éxito de cualquier programa de mejoramiento genético; por lo que es indispensable el conocimiento previo acerca de las relaciones genéticas entre los materiales objeto de mejoramiento para el uso eficiente del germoplasma.

Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten sugerir que los genotipos con caracteres agronómicos deseados de un grupo distante del otro pudieran ser dirigidos en cruces con la intención de generar más variabilidad genética. O sea, la selección de los padres más divergentes para maximizar la heterosis. En este caso, esta selección de padres genéticamente diferentes puede basarse en el origen geográfico, las características agronómicas, y los datos genealógicos reforzados por los datos de los marcadores moleculares.

Conclusiones

Los marcadores ISSR exhibieron un alto polimorfismo en los genotipos evaluados, generando tres agrupaciones que permiten hacer distinciones entre ellos. El análisis de la diversidad genética reveló una estrecha base genética entre los genotipos en regiones intermicrosatélites. Esta variabilidad genética existente en los progenitores, aún cuando es poca, puede ser optimizada en el futuro en los programas de mejoramiento genético para un uso más eficiente de las cruces con fines de obtener mayor variabilidad.

Referencias

- [1] AITKEN, Karen; LI, Jichen; JACKSON, Phillip; PIPERIDIS, George; MCINTYRE, Clement (2006). AFLP analysis genetic diversity within *Saccharum officinarum* and comparison with sugarcane varieties. **Australian Journal of Agricultural Research** 57 (11): 1167-1184.
- [2] ALVES, Clébia; NASCIMENTO, Sue; DE ANDRADE, Gaus; DE BRITO, Júlio; SABINO, Virgínia; DE SILVA, Márcia (2009). Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 33, Edição Especial, p. 1771-1776.
- [3] ANDERSON, J; CHURCHILL, G; AUTRIQUE, J; TANKSLEY, S; SORRELLS, M (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome** 36: 181-186.
- [4] BOTSTEIN, David; WHITE, Raymond; SKOLNICK, Mark; DAVIS, Ronald (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetic** 32: 314-331.
- [5] CORDEIRO, Giovanni; PAN, Yong-Bao; HENRY, Robert (2003). Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane. **Plant Science** 165: 181-189.
- [6] CORDEIRO, Giovanni; TAYLOR, George; HENRY, Robert (2001). Evaluation of microsatellites (Simple Sequence Repeats) as genetic markers in sugar cane. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists** 24: 627-629.
- [7] COTO, O; CORNIDE, M; CALVO, D; CANALES, E; D'HONT, A; PRADA, F (2002). Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with markers. **Euphytica** 123:121-130.
- [8] CRESTE, Silvana; ACCORONI, Klaus; PINTO, Luciana; VENCOVSKY, Roland; GIMENES, M; XAVIER, Mauro; LANDELL, Marcos (2010). Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose me-

- tabolism and drought tolerance genes. **Euphytica** 172: 435-446.
- [9] D'HONT, A; LU, Y.H; GONZÁLEZ de León, D; GRIVET, L; FELDMANN, P; LANAUD, C; GLASZMANN, J. C (1994). A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae tribe. **Genome** 37: 222-230.
- [10] DA COSTA, M; BARBOSA, L; ONOFRE, A; DE MELO, L; DE OLIVEIRA, M; DE CARVALHO, R; BENKO-Iseppon, A (2011). Assessment of Genetic Diversity in Contrasting Sugarcane Varieties Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **American Journal of Plant Sciences** 2: 425-432.
- [11] DEMEY, J; VICENTE-Villardón, J; GALINDO-Villardón, M; ZAMBRANO, A (2008). Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by External Logistic Biplots. **Bioinformatics** 24 (24): 2832-2838.
- [12] DEMEY, Jhonny; ZAMBRANO, Asia; FUENMAYOR, Francia; SEGOVIA, Victoria (2003). Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. **Interciencia** 28 (12): 684-689.
- [13] DEVARUMATH, Rachayya; KALWADE, Sachin; KAWAR, Prashant; SUSHIR, Kapil (2012). Assessment of Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm Using ISSR and SSR Markers. **Sugar Tech.** 14(4): 334-344.
- [14] FAHMY, E.M.; NERMIN M.; ABD, EL-GAWAD; I.H., EL-GEDDAWY; O.M., SALEH; NASRA, M. EL-AZAB (2008). Development of RAPD and ISSR markers for drought tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Egyptian Journal Of Genetics and Cytology** 37: 1-15.
- [15] FEDEAGRO (2011). Estadísticas Agrícolas. Fecha de consulta 01 09 2012. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>
- [16] GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D. (1997). Launching microsatellites: A review of mutprocesses and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity** 88: 335-342.
- [17] HEOA, Moonseong; GABRIEL, Ruben (2001). The fit of graphical displays to patterns of expectations. **Computational Statistics & Data Analysis.** 36: 47-67.
- [18] HOARAU, J.; OFFMANN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J.; GRIVET, L. (2001). Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics** 103: 84-97.
- [19] JANOO, N.; GRIVET, L.; SEGUIN, M.; PAULET, F.; DOMAINGUE, R.; RAO, P.; DOOKIUN, A.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J. (1999). Molecular investigation of genetic base of sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** 99: 171-184.
- [20] KALWADE, Sachin; DEVARUMATH, Rachayya; KAWAR, Prashant; SUSHIR, Kapil (2012). Genetic profiling of sugarcane genotypes using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. **Electronic Journal of Plant Breeding** 3 (1): 621-628.
- [21] KHALED, K.A.M. (2010). Molecular characterization and genetic similarity of three sugarcane genotypes. **Egypt. J. Genet. Cytol.**, 39: 249-257.
- [22] KHAN, F; KHAN, A.; AZHAR, F; RAUF, S. (2009). Genetic diversity of *Saccharum officinarum* accessions in Pakistan as revealed by random amplified polymorphic DNA. **Genetics and Molecular Research** 8: 1376-1382.
- [23] LIMA, M.; GARCÍA, A.; OLIVEIRA, K.; MATSOUKA, S.; ARIZONO, A.; SOUZA, C.; SOUZA, A. (2002). Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics** 104: 30-38.
- [24] LIU, Pingwu; QUE, Youxiong; PAN, Yong-Bao (2011). Highly Polymorphic Microsatellite DNA Markers for Sugarcane Germplasm Evaluation and Variety Identity Testing. **Sugar Tech** 13 (2): 129-136.
- [25] PAN, Yong-Bao; CORDEIRO, Giovanni; RICHARD, Edward; HENRY, Robert (2003). Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatellite DNA marker. **Maydica** 48:319-329.
- [26] PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MARCONI, T.; GARCIA, A.; ULIAN, E.; SOUZA, A. (2006). Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. **Plant Breeding** 125: 378-384.
- [27] PIPERIDIS, G.M.J.; CHRISTOPHER, B.J.; CARROLL, N. Berding; D'HONT, A. (2000). Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. **Genome** 43:1033-1037.
- [28] PROCAÑA (2001). Historia de la caña de azúcar. Fecha de Consulta (20, 10, 2011). Disponible en: <http://www.jas-multimedia.com/webpages/procana/hica0001.htm>.
- [29] RIASCO, John; VICTORIA, Jorge; ÁNGEL, Fernando (2003). Diversidad genética en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) usando marcadores moleculares. **Revista colombiana de biotecnología** V (1): 6-15.
- [30] SCHENCK, S.; CREPEAU, M.; WU, K.; MOORE, P.; YU, Q.; MING, R. (2004). Genetic diversity and relationships in native Hawaiian *Saccharum officinarum* sugarcane. **Journal of Heredity** 95: 327-331.
- [31] SHEJI, M.; NAIR, N.; CHATURVEDI, P.; SELVI, A. (2006). Analysis of genetic diversity among *Saccharum spontaneum* L. from four geographical regions of India, Using Molecular Markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** 53, (6): 1221-1231.
- [32] SINGH, R.; MISHRA, S.; SINGH, S.; MISHRA, N.; SHARMA, M. (2010). Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science** 4 (2):116-125.
- [33] SNEATH, Peter; SOKAL, Robert (1973). **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification.** Freeman W.H. and Co. San Francisco. USA. 573pp.
- [34] SRIVASTAVA, S.; GUPTA, P.S. (2008). Inter simple sequence repeat profile as a genetic marker system in sugarcane. **Sugar Tech** 10 (1): 48-52.

- [35] TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSQUOT, J. CHARRIER, A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics** 98: 171-177.
- [36] WANG, Ying; ZHUANG, Nan-Sheng; GAO, He-Gong; HUANG, Dong-Yi (2007). ISSR analysis for sugarcane germplasm. **Journal of Hunan Agricultural University** (Natural Sciences). Disponible en: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HNND2007S1034.htm.
- [37] ZHANG, Mu-Qing; ZHENG, Xue-Fang; YU, Ai-Li; XU, Jing-Sheng; ZHOU, Hui (2004). Molecular Marker Application in Sugarcane. **Sugar Tech** Vol. 6 (4): 251-259.
- [38] ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.
-