

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS TABASCO**

PROGRAMA EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE VARIEDADES DE CAÑA  
DE AZÚCAR CULTIVADAS EN EL ESTADO DE TABASCO**

**VIANEY GONZÁLEZ JIMÉNEZ**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO  
2009

La presente tesis, titulada: **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR CULTIVADAS EN EL ESTADO DE TABASCO**, realizada por la alumna: **VIANEY GONZÁLEZ JIMÉNEZ**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN  
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERO:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. APOLONIO VALDEZ BALERO**

**ASESOR:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO**

**ASESOR:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JULIÁN PÉREZ FLORES**

**ASESOR:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. CARLOS FREDY ORTIZ GARCÍA**

**H. Cárdenas, Tabasco, septiembre de 2009**

# CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR CULTIVADAS EN EL ESTADO DE TABASCO

## RESUMEN

Vianey González Jiménez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2009.

Se llevó a cabo una caracterización morfológica de 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco mediante descriptores morfológicos, se identificó la filogenia por medio de secuenciamiento de la región ITS de DNA ribosómico y *trnL-F* cloroplástico, y se hizo una caracterización molecular usando la técnica AFLP. La descripción fenotípica se llevó a cabo considerando las características de entrenudo, hoja y yema. En la amplificación del DNA ribosómico se utilizaron los iniciadores *ITS4* e *ITS5*. Para la amplificación del cloroplasto se utilizaron los iniciadores universales *trnL-F*. El procedimiento para la realización de los AFLPs se realizó siguiendo las recomendaciones descritas en el Kit AFLP® *Analysis System I* y AFLP® *Starter Primer Kit*. Entre las 12 variedades de caña de azúcar evaluadas se encontraron diferencias fenotípicas; en lo que respecta a la forma del entrenudo se formaron tres grupos diferentes. El grupo I caracterizado por su forma cilíndrica lo integraron las variedades, C 87-51, Mex 91-130, ATM 96-40, RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, CP 72-2086, Mex 69-290 y Mex 68-P-23. El grupo II caracterizado por su forma cóncavo-convexo lo integraron las variedades Mex 57-1285 y B 4362 y en el grupo III lo conformó la variedad Mex 59-32 quien presentó forma abarrilado. En la forma de la yema seis variedades presentaron ovoide, el resto presentó formas diferentes, en la conformación de la hoja predominó la forma erecta con el ápice curvado. La amplificación y secuenciación de la región *trnL-F* de cloroplasto y de la región ITS del DNA ribosómico, permitió la identificación de las variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco encontrándose que pertenecen a *Saccharum officinarum*. En la evaluación molecular con la técnica AFLP, la combinación E-ACC/M-CTA fue la que mostró mayor polimorfismo, el tamaño de los fragmentos polimórficos osciló desde 72 hasta 1353 pb. El dendrograma reveló tres grupos distintos de *Saccharum* spp. El grupo I comprendió las variedades C 87-51, ATM 96-40, B 4362, Mex 69-290, Mex 57-1285 y Mex 91-130, las cuales presentaron un 0.77% de similitud genética. El grupo II comprendió las variedades, RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, Mex 59-32 y CP 72-2086, las cuales formaron un conglomerado, por consiguiente un 0.70% de características genéticas similares. El grupo III lo integró la variedad Mex 68-P-23. De las variedades analizadas esta última fue la que presentó una menor similitud genética con un 0.22% con el resto de las variedades.

**Palabras claves:** Caña de azúcar, AFLPs, DNA, variabilidad.

# MOLECULAR AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF VARIETIES OF GROWN SUGARCANE IN THE TABASCO STATE

## SUMMARY

Vianey González Jiménez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2009.

A morphologic characterization of 12 varieties of sugarcane of from Tabasco state by using morphologic descriptors was performed, the phylogeny by sequencing of chloroplast region ITS of ribosome DNA and *trnL-F* was identified, and a molecular characterization was done by using technique AFLP. The phenotypic description considered the characteristics of internode, leaf and bud. In the amplification of the ribosome DNA *ITS4* and *ITS5* primers were used. For the amplification of the chloroplast the universal were used *trnL-F* initiators. The AFLPs were done following the described recommendations in the Kit AFLP®Analysis System I and AFLP® Starter First Kit. Among the 12 varieties of evaluated sugarcane had phenotypic differences; regarding internode form three different groups were formed. The varieties C 87-51, Mex 91-130, ATM 96-40, RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, CP 72-2086, Mex 69-290 and Mex 68-P-23, characterized by a cylindrical internode integrated. The second group integrated by the varieties Mex 57-1285 and B 4362 presented concave-convex internode the variety Mex 59-32 presented abarrilado internode. Regarding to bud six varieties presented ovoid form, the rest presented different forms. The standing the with the curved apex was the most common leaf. The amplification and sequencing of the region *trnL-F* of chloroplast and region ITS of the ribosome DNA, allowed the identification of the 12 varieties of sugarcane and showed that they belong to the *Saccharum officinarum* species. In the molecular evaluation with AFLP, the combination E-ACC/M-CTA showed the major polymorphism; the size of polymorphic fragments ranged from 72 to 1353 pb. The dendrogram revealed three different groups from *Saccharum* spp. The group first included the varieties C 87-51, ATM 96-40, B 4362, Mex 69-290, Mex 57-1285 and Mex 91-130, which presented a 0.77% of genetic similarity. The second group included the varieties RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, Mex 59-32 and CP 72-2086, which formed a conglomerate, with a 0.70% of genetic similarity. Group III range as part of the Mex-68 P-23. Of the evaluated varieties the latter presented a lower genetic similarity with a 0.22% compared to the varieties.

**Key words:** Sugarcane, AFLPs, DNA, variability

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico aportado durante mis dos años de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por permitirme realizar mi maestría en el programa de Producción Agroalimentaria en el Trópico (PROPAT).

A la Línea Prioritaria de Investigación 5 (LPI5) Biotecnología microbiana, vegetal y animal por el apoyo económico para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por apoyarme en la realización de mi tesis en la parte laboratorio, por sus aportaciones, comentarios, y su dedicación por enseñar a los demás.

Al Dr. Fernando Carlos Gómez Merino, por su apoyo económico, por sus aportaciones y comentarios en la realización de mi investigación.

A los integrantes de mi consejo particular: Dr. Apolonio Valdez Balero, Dr. Julián Pérez Flores, Dr. Carlos Fredy Ortiz. García por sus aportaciones en la realización de mi tesis.

Al MC. Francisco Meléndez Nava, por su amistad, por su apoyo, consejos para seguir estudiando la maestría.

## **DEDICATORIA**

Al único ser capaz de entregar tantas bendiciones en una sola vida, **Jehová, Dios.**

### **A mis padres:**

#### **Adela Jiménez Hernández y Carlos González Sánchez**

Por ser mi ejemplo, mi motivación de lucha día tras día, por inculcar en mí los más bellos valores de la vida, por estar siempre presente en mi vida.

### **A mis Hermanos:**

José Luis, Raquel, Leydi, Carlos y Esmeralda, por formar parte de mi vida y por compartir conmigo tantos buenos momentos.

### **A mis sobrinos:**

Kevin, Yatziry, Shirley, Pamela, Roger y Karla por mantener siempre nuestro hogar lleno de alegría, unión y travesuras.

### **A mi amiga Aurora:**

Gracias por tu bella amistad por tu confianza, consejos, y actos llenos de sinceridad, por cada uno de los momentos compartidos, espero y siempre seamos las mejores amigas.

### **A mi amigo Benigno:**

Por tu sincera amistad, por saber escuchar y cada uno de tus valiosos consejos.

### **A mis otros grandes amigos:**

Vinicio, Pedro, German, Manuel, Nelson, Wagner, Miriam, por estar siempre presente en mi vida por compartir tan gratos momentos y poder contar siempre con cada uno de ellos.

### **A mis compañeros de generación 2006 – 2007**

# CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>SUMMARY</b> .....	ii
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>2.1. OBJETIVOS</b> .....	4
2.1.1. Objetivo general .....	4
2.1.2. Objetivos específicos .....	4
<b>2.2. HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
<b>3.1. El cultivo de la caña de azúcar</b> .....	5
3.1.1. Origen .....	5
3.1.2. Botánica de la caña de azúcar .....	6
3.1.3. Clasificación taxonómica .....	8
3.1.4. Especies del género <i>Saccharum</i> .....	8
3.1.4.1. <i>Saccharum officinarum</i> .....	8
3.1.4.2. <i>Saccharum spontaneum</i> .....	9
3.1.4.3. <i>Saccharum robustum</i> .....	9
3.1.4.4. <i>Saccharum sinensis</i> .....	9
3.1.4.5. <i>Saccharum barberi</i> .....	10
3.1.4.6. <i>Saccharum edule</i> .....	10
3.1.5. Propagación de la caña de azúcar .....	10
3.1.6. Tipos de marcadores .....	11
3.1.6.1. Marcadores morfológicos .....	11
3.1.6.2. Marcadores genéticos .....	11
3.1.6.3. Marcadores bioquímicos .....	12
3.1.7. Marcadores moleculares utilizados en plantas .....	12

3.1.7.1. RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) .....	13
3.1.7.2. Marcadores basados en la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	13
3.1.7.2.1. RAPD (Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico) .....	14
3.1.7.2.2. SSR (Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas).....	14
3.1.7.2.3. AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados).....	15
3.1.8. Marcadores utilizados en caña de azúcar.....	17
3.1.9. Filogenia de la caña de azúcar .....	18
3.1.9.1. DNA ribosómico .....	19
3.1.9.2. DNA cloroplástico.....	19
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA .....</b>	<b>20</b>
4.1.1. Localización .....	20
4.1.2. Descriptores fenotípicos.....	20
4.1.2. 1. Entrenudo.....	20
4.1.2.2. Yema.....	22
4.1.2.3. Hoja.....	24
<b>4.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GÉNERO <i>Saccharum</i>.....</b>	<b>27</b>
4.2.1. Variedades de caña de azúcar. ....	27
4.2.2. Extracción del DNA .....	27
4.2.3. Amplificación mediante ITS (Internal Transcribed Spacer).....	28
4.2.4. Amplificación mediante iniciadores <i>trnL-F</i> .....	28
4.2.3. Alineamiento de secuencias .....	30
<b>4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA TÉCNICA AFLP .....</b>	<b>31</b>
4.3.1. Digestión genómica del DNA .....	31
4.3.2. Ligación de adaptadores.....	31
4.3.3. Pre - amplificación.....	31
4.3.4. Amplificación selectiva .....	32
4.3.5. Análisis estadístico.....	33
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA .....</b>	<b>34</b>



<b>5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GÉNERO <i>Saccharum</i></b> .....	47
5.2.1 Amplificación de la región <i>trnL-F</i> de cloroplasto .....	47
5.2.2. Amplificación de la región ITS del rDNA .....	50
<b>5.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA TÉCNICA AFLP</b> .....	51
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....	56
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b> .....	56

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco, utilizadas en este estudio. ....	27
<b>Cuadro 2.</b> Secuencia de los iniciadores <i>trnL-F</i> utilizados en el estudio.....	29
<b>Cuadro 3.</b> Reactivos usados en la pre-amplificación en caña de azúcar .....	31
<b>Cuadro 4.</b> Combinaciones de iniciadores en caña de azúcar.....	32
<b>Cuadro 5.</b> Reactivos usados en la amplificación selectiva de caña de azúcar.....	32
<b>Cuadro 6.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad C 87-51.....	34
<b>Cuadro 7.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad Mex 57-1285 .....	35
<b>Cuadro 8.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad Mex 59-32 .....	36
<b>Cuadro 9.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad Mex 91-130 .....	37
<b>Cuadro 10.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad ATM 96-40.....	38
<b>Cuadro 11.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad RD 75-11 .....	39
<b>Cuadro 12.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad Mex 79-431 .....	40
<b>Cuadro 13.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad B 4362 .....	41
<b>Cuadro 14.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad Mex 69-290 .....	42
<b>Cuadro 15.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad SP 70-1284 .....	43
<b>Cuadro 16.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad CP 72-2086 .....	44
<b>cuadro 17.</b> Descripción del entrenado, yema y hoja de la variedad Mex 68-P-23 .....	45

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Pasos de la técnica AFLP.....	16
<b>Figura 2.</b> Esquema de un entrenudo. ....	20
<b>Figura 3.</b> Aspecto longitudinal de tallos de caña de azúcar: A) Cilíndrica; B) Abarrilado; C) En forma de huso; D) Conoidal; E) Obconoidal; F) Cóncavo convexo. ....	21
<b>Figura 4.</b> Bandas de raíces de entrenudos de caña de azúcar: A) Cilíndrica; B) Abobinada; C) Cónica; D) Obcónica. ....	22
<b>Figura 5.</b> Forma más comunes de la yema en caña de azúcar: A) Ovoide; B) Ovoide Angosta; C) Deltoide larga; D) Deltoide corta; E) Romboide; F) Pentagonal; G) Pentagonal con alas en la parte superior; H) Ovoide angosta con alas prominentes en la parte superior; I) Redonda con alas laterales; J) Redonda con poro germinal central; K) Ovoide con alas pronunciadas; L) Ovoide con alas secundarias.....	23
<b>Figura 6.</b> Características de la lámina o vaina de la hoja de la caña de azúcar: 1) Ausencia; 2) Escasos; 3) Regular; 4) Cuantiosos.....	24
<b>Figura 7.</b> Tipos de aurículas en caña de azúcar: 1) Transitoria Oblicua; 2) Transitoria horizontal; 3) Transitoria ascendente; 4) Dental; 5) Deltoides; 6) Lanceolada corta; 7) Abultada; 8) Espoloneada; 9) Aguda; 10) Lanceolada.....	25
<b>Figura 8.</b> Tipos de lígula de caña de azúcar: 1) Deltoide; 2) Lineal; 3) Creciente; 4) Arco. ....	25
<b>Figura 9.</b> Tipos de collar de caña de azúcar: A) Deltoides; B) Rectangular; C) Ligular. ....	26
<b>Figura 10.</b> Ubicación aproximada de iniciadores <i>trnL-F</i> . ....	29
<b>Figura 11.</b> Localización de los genes <i>trnL-F</i> en el genoma del cloroplasto de <i>Sacharum officinarum</i> . ....	30

<b>Figura 12.</b> Amplificaciones de las 12 variedades de caña de azúcar mediante iniciadores <i>trnL-F</i> . Variedades: Dilución 1:5: 1) C 87-51; 2) Mex 57-1285; 3) Mex 59-32; 4) Mex 91-130; 5) ATM 96-40; 6) RD 75-11; 7) Mex 79-431; 8) B 4362; 9) Mex 69-290; 10) SP 70-1284; 11) CP 72-2086; 12) Mex 68-P-23; Marcador 1 Kb. Dilución 1:30: 1) C 87-51; 2) Mex 57-1285; 3) Mex 59-32; 4) Mex 91-130; 5) ATM 96-40; 6) RD 75-11; 7) Mex 79-431; 8) B 4362; 9) Mex 69-290; 10) SP 70-1284; 11) CP 72-2086; 12) Mex 68-P-23; Marcador 1 Kb. ....	47
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético construido con las secuencias correspondientes al gen <i>tRNAL</i> de cloroplasto de 12 variedades de caña de azúcar, mediante el método Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei con 1000 repeticiones Bootstrap. ....	48
<b>Figura 14.</b> Secuencias de aminoácidos de caña de azúcar del estado de Tabasco y de <i>Sacharum officinarum</i> . ....	49
<b>Figura 15.</b> Análisis de los ITS amplificados en 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco mediante iniciadores <i>trnL- trnF</i> . Variedades: 1) C 87-51, 2) Mex 57-1285, 3) Mex 59-32, 4) Mex 91-130, 5) ATM 96-40, 6) RD 75-11, 7) Mex 79-431, 8) B 4362, 9) Mex 69-290, 10) SP 70-1284, 11) CP 72-2086, 12) Mex 68-P-23, M) Marcador 1 Kb. ....	50
<b>Figura 16.</b> Combinación E-ACC/M-CTA. Variedades: 1) 87-51, 2) Mex 57-1285, 3) Mex 59-32, 4) Mex 91-130, 5) ATM 96-40, 6) RD 75-11, 7) Mex 79-431, 8) B 4362, 9) Mex 69-290, 10) SP 70-1284, 11) CP 72-2086, 12) Mex 68-P-23, 13) Control +, M) Marcador ( $\Phi$ X 174/Hae – III). ....	52
<b>Figura 17.</b> Dendrograma basado en la similitud genética AFLP de 12 variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco. ....	54

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La caña de azúcar (*Saccharum* spp) es uno de los cultivos más antiguos del mundo y de mayor importancia industrial en las zonas tropicales y subtropicales, en más de 99 países. A nivel mundial, Brasil e India contribuyen con el 50% (el primero aporta el 28 % y el segundo 22% de la producción, respectivamente), seguidos por China, Tailandia, Pakistán y México (USDA, 2008).

En México, la caña de azúcar se cultiva en 716,863.47 ha, las cuales producen 50,060,254.17 t, con rendimiento promedio nacional de 75.52 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2007). En el estado de Tabasco se cultivan en 27,481.00 ha, con rendimientos promedio de 56.25 t ha<sup>-1</sup> el cual está por debajo del rendimiento medio nacional que es de 75 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2007).

La caña de azúcar como otro cultivo de importancia económica tiene descensos en su rendimiento por efecto de factores bióticos y abióticos, por ello el agricultor demanda nuevas variedades con características deseables.

Los cultivares modernos de caña de azúcar, que actualmente se cultivan en el mundo, son en gran medida, el resultado del intercruzamientos realizados a partir de la primera cruce interespecífica llevada a cabo al principio del siglo pasado, entre *S. officinarum*, *S. spontaneum* y *S. barberi* (Grivet y Arruda, 2002; Lima *et al.*, 2002).

En las dos últimas décadas diversos autores (Baksha *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 1994) señalaron la necesidad de crear nuevos clones que posean un mayor rendimiento de azúcar, resistencia alta a los factores abióticos, bióticos y de fácil manejo agronómico. Algunos autores mencionan que *S. officinarum* es una especie octoploide con un número cromosómico  $2n = 80$  y  $x = 10$  (Stevenson, 1965). Por tal razón, se piensa que los clones comerciales son el producto de numerosas hibridaciones con números cromosómicos elevados ( $2n = 100 - 130$ ) debido a fenómenos de euploidia y aneuploidía (Grivet y Arruda, 2001) por lo que la caracterización de las variedades de caña de azúcar es un aspecto importante en la generación de nuevas variedades.

La clasificación del género *Saccharum* se ha llevado a cabo por diversos botánicos en distintos países (Artschwager, 1954; Artschwager y Brandes, 1958) con base a las características morfológicas de la hoja, tallo e inflorescencia.

Artschwager y Brandes (1958), Daniels y Roach (1987), clasificaron el género *Saccharum* en seis especies: *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, y *S. edule*. Al respecto, Ramdoyal y Badaloo (2002) argumentan que la caracterización de genotipos de caña de azúcar de acuerdo a patrones morfológicos, es de suma importancia para efectos de conservación, evaluación, documentación y realización de intercambios de material vegetal. A nivel de productores, es deseable conocer el comportamiento agronómico de cada variedad en diferentes ambientes. Por otra parte, Laborde *et al.* (2008) señalaron que la caña de azúcar es un cultivo, que por su importancia económica, requiere que el agricultor le asigne valor productivo a cada variedad, ya que esto le permitirá decidir si se continúa en cultivo comercial.

La caracterización fenotípica es de gran importancia para el mejoramiento genético porque facilita describir la variabilidad en caracteres de interés y así mismo distinguir variedades. Las variedades de caña de azúcar se han caracterizado e identificado mediante marcadores morfológicos y agronómicos del tallo (ceras, color), y hoja (vainas, margen, pubescencia). La desventaja de estos estudios es que el proceso de selección se requiere de 10 a 15 años después de realizar las cruces (Pérez *et al.*, 1997).

Existen técnicas que reducen el tiempo de selección, como por ejemplo los marcadores moleculares que se pueden usar para la evaluación de la variabilidad genética de un cultivo. Los marcadores más utilizados para la caracterización de plantas son los bioquímicos y los marcadores basados en el DNA, entre los que se pueden citar RFLP, RAPD, AFLP y Microsatélites (Rallo *et al.*, 2002).

Mediante la amplificación de DNA por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), estos marcadores permiten la identificación y el aislamiento de genes de interés. Actualmente se están utilizando en el trazado genético de la caña de azúcar (Hoarau *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2003), así como en la deducción de inferencias acerca de la variabilidad genética y las interrelaciones entre los genotipos a nivel de DNA (Lima *et al.*, 2002; Cordeiro *et al.*, 2003), entre lo que destaca la construcción de mapas genéticos en variedades comerciales (Aitken *et al.*, 2005).

En el estado de Tabasco no existe información sobre caracterización molecular de las variedades de azúcar cultivadas. Lo anterior limita el manejo adecuado del

cultivo, ya que cada variedad expresa su potencial productivo de diferente forma, al cultivarse en diferentes ambientes (Bissessur *et al.*, (2000) Rea y Vieira, 2002). Por tal motivo se realizó el presente estudio con el fin de caracterizar fenotípica y molecularmente variedades de caña de azúcar cultivadas en la región para conocer si existe diferencia genética entre ellas.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1. OBJETIVOS

#### 2.1.1. Objetivo general

Caracterizar 12 variedades cultivadas de caña de azúcar del estado de Tabasco a nivel fenotípico y molecular.

#### 2.1.2. Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar fenotípicamente 12 variedades de caña de azúcar que se cultivan en el estado de Tabasco mediante descriptores morfológicos.
  
- ❖ Identificar la filogenia de 12 variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp) por medio de secuenciamiento de la región ITS de DNA ribosómico y *trnL-F* cloroplástico.
  
- ❖ Caracterizar la variabilidad genética en variedades de caña de azúcar mediante la técnica AFLP.

### 2.2. HIPÓTESIS

- ❖ Existe variabilidad fenotípica y genética entre variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco.
  
- ❖ Las 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco pertenecen a *Saccharum officinarum*



### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. El cultivo de la caña de azúcar

##### 3.1.1. Origen

Se considera que la región que comprende parte de la India, China, Nueva Guinea y zonas aledañas son el centro de origen de la caña de azúcar, por encontrarse ahí el mayor número de especies (Ruiz, 1995). También se piensa que tiene un centro de origen genético y uno botánico. El primero se dio en las zonas de Nueva Guinea, y su origen botánico es la India, de donde se extendió su cultivo a Arabia, Egipto y Etiopía. Posteriormente se difundió a otras zonas como la isla de Madeira, a las islas Canarias y Santo Domingo en 1506. Luego a Paraguay, Argentina y demás colonias en el Continente Americano (Humber, 1974).

El género *Saccharum* está constituido por seis especies: *S. officinarum*, *S. edule*, *S. barberi*, *S. sinensis*, *S. spontaneum* y *S. robustum*. Las cuatro primeras corresponden a las especies domesticadas y las dos últimas a las especies silvestres (Guimaraes y Sobral, 1998). Las especies que se han utilizado para el mejoramiento genético del género *Saccharum* son *S. officinarum* y *S. spontaneum*, las cuales han contribuido al origen de nuevas variedades. La especie *Saccharum officinarum* es conocida como la de mayor producción de azúcar; su centro de origen se encuentra en Nueva Guinea y sus islas circundantes y se cree que es descendiente de *S. robustum* por presentar características similares (Irvine, 1999). Otras teorías afirman que *Saccharum officinarum* evolucionó a través de la hibridación de especies como *Erianthus arundinaceus*, *S. spontaneum* y *S. robustum* (Daniels y Roach, 1975), aunque en la actualidad se ha comprobado que no se puede obtener híbridos fértiles entre las cruces de *Erianthus arundinaceus* y *Saccharum* ssp (Cai et al., 2005).

La composición del genoma de la caña de azúcar es de 100 a 130 cromosomas. Las variedades son en 70 - 80% derivados de *S. officinarum* que es la que aporta la sacarosa, 10 - 20% derivados de *S. spontaneum* y el 5 - 15% de recombinación de cromosomas entre las dos especies (Piperidis y D'Hont, 2001).

Hoy en día los programas de mejoramiento genético en caña de azúcar han logrado limitados progresos en el mejoramiento del contenido de azúcar de la caña

(Jackson, 2005). Se piensa que es por la estrecha base genética de los cultivares modernos que existen en todo el mundo ya que unos pocos progenitores se utilizaron en la hibridación inicial interespecífica y el proceso de nobilización (Berding y Roach, 1987; Deren, 1995).

### **3.1.2. Botánica de la caña de azúcar**

Las partes básicas de la caña de azúcar que determinan su forma son: la raíz, el tallo, la hoja y la flor (Ruiz, 1995).

#### **a) Raíz**

La función principal del sistema radical es la de absorber agua y nutrientes, proporcionar el anclaje y almacenar sustancias de reserva. La raíz primaria está ubicada en el embrión, mientras que las raíces adventicias se originan en el tallo. Presenta dos tipos de raíces las primordiales y las permanentes. Las partes estructurales internas de la raíz de la caña de azúcar son la epidermis, la corteza y el tejido vascular. La epidermis está formada por grupos de células con paredes muy delgadas, a partir de las cuales se originan los pelos absorbentes. La corteza está comprendida entre la epidermis y el tejido vascular, y consiste en capas de células que se desintegran a medida que la raíz crece. El tejido vascular se distribuye internamente en forma radial en grupos alternos de células del xilema y el floema, protegidas por un tejido fibroso. En el extremo de la raíz se encuentra el punto de crecimiento protegido por la cofia, que le permite penetrar las partículas del suelo.

#### **b) Tallo**

Es el órgano de mayor importancia desde el punto de vista económico, debido a que en él se almacenan los carbohidratos, producto de la fotosíntesis de la planta, posteriormente por procesos industriales, se obtiene el azúcar y otros derivados como, bagazo, cachaza y melaza. Se desarrollan dos tipos de tallos: el subterráneo o rizoma y el tallo aéreo, que es el que se aprovecha para la extracción del azúcar. El tallo se forma a partir de la yema y está formado por nudos y entrenudos; en cada nudo está inserta una hoja; las hojas se distribuyen en forma alterna, en cuya axila se encuentra

la yema y en el extremo distal del tallo se encuentra el meristemo apical. El color del tallo generalmente es verde, pero existen otras coloraciones como son amarillas, rojizas, moradas y combinaciones debido a la presencia de pigmentos como xantofilas, antocianinas, carotenos y clorofila.

### **c) Hoja**

Las hojas de la caña de azúcar se originan en los nudos y se distribuyen en posiciones alternas a lo largo del tallo a medida que éste crece. Es un órgano especializado cuya principal función es la de llevar a cabo la fotosíntesis, proceso mediante el cual los cloroplastos convierten la energía lumínica en energía química. Las hojas también cumplen un papel importante en el proceso de la respiración celular, la transpiración y en el intercambio gaseoso. Sus partes son: lámina, nervadura central, vaina, lígula, y aurícula.

### **d) Flor**

La caña de azúcar presenta dos fases de desarrollo. La vegetativa, originada por la división celular en los puntos de crecimiento; y la reproductiva o de floración, que es una continuación de la anterior. Las condiciones ambientales de hora luz y temperatura, tienen una influencia directa para que la inflorescencia ocurra. La inflorescencia es una panícula abierta, cuya forma, color, tamaño y ramificación dependen de la variedad. La longitud de la panícula de *S. officinarum* es larga, en *S. sinense* intermedia, y en *S. spontaneum* y *S. barberi* es más corta. La ramificación es mayor en la base y disminuye en la parte superior hasta terminar en un solo eje. La formación de la flor en la caña de azúcar tiene aspectos benéficos y desventajas. La principal ventaja es que constituye una fuente de material para trabajar en los programas de mejoramiento genético, en tanto que la desventaja desde el punto de vista agronómico es la paralización del crecimiento, que asociado con la formación de “corcho”, es un aspecto indeseable en el tallo ya que disminuye el rendimiento, llegando a causar pérdidas en sacarosa.

### 3.1.3. Clasificación taxonómica

De acuerdo al NCBI (2008) taxonómicamente la caña de azúcar se clasifica de la siguiente manera.

**Reino:** Eukaryota

**Subreino:** Cormobionta

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Orden:** Poales

**Familia:** Poacea

**Subfamilia:** Panicoideae

**Tribu:** Andropogonoidea

**Género:** *Saccharum*

**Especies:**

*Saccharum officinarum*

*Saccharum barberi*

*Saccharum edule*

*Saccharum sinense*

*Saccharum robustum*

*Saccharum spontaneum*

### 3.1.4. Especies del género *Saccharum*

#### 3.1.4.1. *Saccharum officinarum*

Es conocida como caña noble, por el alto contenido de sacarosa que presenta y su bajo contenido de fibra (Taupier, 1983). Contiene de  $2n = 70$  a  $2n = 140$  cromosomas (D'Hont *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 1999). Sus tallos son vigorosos, altos y gruesos. Sus características principales son su alto contenido de sacarosa, altura media y bajo contenido de fibra. Se piensa que surgió de la domesticación de caña silvestre (*S. robustum*) (Ruiz, 1995). Otras teorías afirman que evolucionó de *Saccharum spontaneum*, *Miscanthus anderss* y *Erianthus arundinaceus* (Daniels y Roach, 1987).

#### **3.1.4.2. *Saccharum spontaneum***

Es una especie silvestre que muestra gran variabilidad y un amplio número de cromosomas ( $2n = 36$  a  $128$ ) (Irvine, 1999). Produce poco azúcar pero se adapta a diferentes ambientes y es resistente a varias enfermedades. Se encuentra distribuida en Japón, Nueva Guinea, la zona del Mediterráneo y África. Se cree que la India es su centro de origen (Daniels *et al.*, 1975). Sus tallos son delgados, de mediana altura, hojas angostas, entrenudos largos y rectos, tiene alto contenido de fibra y bajo en sacarosa, las hojas son en forma de correa, reducidas de normalmente a una nervadura mediana, son rugosas, erectas y cortantes. El rizoma se extiende considerablemente dando lugar a una multitud de cañas cortas, finas de 5 a 10 mm de diámetro. Se adapta muy bien a la sequía, es resistente a enfermedades, tolera el frío y es capaz de desarrollarse en condiciones adversas, por tales motivos es utilizada frecuentemente por los fitomejoradores (Ruiz, 1995).

#### **3.1.4.3. *Saccharum robustum***

Es una especie silvestre con una distribución natural desde Borneo, a través de Nueva Guinea (Booker, 2004). Presenta clones de  $2n = 60$  o  $2n = 80$ , pero también hay otras formas con más de 200 cromosomas (Price, 1968). Tiene hojas anchas y curvadas hacia abajo, a veces pubescentes; los tallos delgados de 20 a 30 mm de diámetro, están totalmente privados de azúcar, son pobres en agua, y por lo tanto esencialmente leñosos. Es un tipo de caña alta, de gran porte, gruesa y vigorosa, con alto contenido de fibra y bajo de sacarosa. Otras características que presenta es la falta de rizomas, las inflorescencias grandes y pequeñas espiguillas (Grassl, 1974).

#### **3.1.4.4. *Saccharum sinensis***

Originaria de China e India, sus tallos son altos, de grosor medio. Algunas variedades tienen tallos delgados, con alto contenido de fibra y pobre en sacarosa. Sus hojas son angostas, las vainas se adhieren fuertemente al tallo, algunas variedades son resistentes a la sequía y enfermedades, su sistema radical está bien desarrollado, se adapta a condiciones desfavorables de clima y suelo. *Saccharum sinensis* ( $2n = 104$  a  $124$ ), y *S. barberi* ( $2n = 60$  a  $140$ ) (D'Hont *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 1999), son dos

especies formadas de la hibridación natural entre *S. officinarum* y *S. spontaneum* en China e India, respectivamente (Price, 1968).

#### **3.1.4.5. *Saccharum barberi***

Originaria del norte de la India, se caracteriza por su altura media, tallos delgados, entrenudos largos y cilíndricos, secciones corchosas en la superficie de los entrenudos, hojas angostas y cortas, bajo contenido de sacarosa. Su sistema radical está muy desarrollado, se adapta bien en condiciones adversas de suelo y clima (Barber, 1922). Según Parthasarathy (1946), *S. barberi* evolucionó de *S. spontaneum* y *S. officinarum*, pero Grassl (1977) descarta esta cruce ya que *S. officinarum* llegó a India sólo después de 600 a.C.

#### **3.1.4.6. *Saccharum edule***

Es originaria de Nueva Guinea y Melanesia. Su número de cromosomas es  $2n = 60$  a  $122$  (D'Hont *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 1999). Representa un grupo pequeño de cañas estéril. Su proceso deriva de la hibridación intergeneracional (Daniels y Roach, 1987). También se piensa que *S. edule*, muy probablemente, surgió de *S. robustum* o *S. officinarum* (Williams *et al.*, 1974).

#### **3.1.5. Propagación de la caña de azúcar**

La propagación de la caña de azúcar principalmente ha sido a partir de yemas. Sin embargo, con el avance en los últimos años de la tecnología se ha multiplicado mediante cultivo de tejido (Salazar, 1986). Este método de propagación por tejidos es el más utilizado para realizar mejoramiento genético ya que las plantas propagadas *in vitro* presentan un mayor crecimiento y vigor, produciendo semillas de alta calidad (Vasil, 1980).

Para obtener nuevas variedades de caña de azúcar se necesita un programa de mejoramiento genético. A través de la hibridación se obtiene semilla por autofecundaciones, o mediante cruces entre variedades o entre especies. Lo que se busca es reducir variabilidad y posteriormente mediante el proceso de selección tener nuevas variedades que sean resistentes a ciertas enfermedades e insectos que reducen su producción en campo.

La caña de azúcar tiene la ventaja de poder cruzarse con otras especies y géneros que estén muy relacionados, debido a la compatibilidad de gametos. Entre los géneros con los que se puede cruzar se encuentran *Sclerostachya*, *Sorghum*, *Narenga*, *Erianthus* y *Zea* (Ruiz, 1995).

### **3.1.6. Tipos de marcadores**

Los marcadores utilizados en el análisis genético de plantas se dividen en: a) marcadores morfológicos b) genéticos y c) marcadores bioquímicos.

#### **3.1.6.1. Marcadores morfológicos**

Los marcadores morfológicos se han empleado con gran éxito para el mejoramiento vegetal, la identificación de especies, familias y géneros de plantas. También para el establecimiento de colecciones y han sido tema de numerosos estudios en genética de poblaciones, han contribuido al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). En agricultura se han utilizado como caracteres con utilidad agronómica en algunos cultivos entre los que se encuentran el tomate, maíz y girasol.

#### **3.1.6.2. Marcadores genéticos**

La información genética de las plantas se encuentra almacenada en el DNA en los cromosomas nucleares y en el genoma de los organelos (Phillips, 1998). Los genes controlan las características de la plantas y se localizan en segmentos específicos de cada cromosoma (King y Stansfield, 1990).

Según Curtis (2000) cada molécula de DNA está formada por una doble hélice, que se forma a partir de dos hebras complementarias de nucleótidos, mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases purinas (adenina, guanina) y las bases pirimidínicas (timina, citosina). Para identificación específica de genes localizados en un cromosoma de interés particular, muchos científicos utilizan el método indirecto llamado marcado genético (Semagn *et al.*, 2006).

Un marcador genético puede definirse como: a) un cromosoma o alelo que permite copiar una región específica del DNA, b) un fragmento específico del DNA, conocido con una posición en el genoma y c) un gen cuya expresión fenotípica es

apreciada fácilmente, usado para identificar una célula portadora o como un probable marcador de núcleo, cromosoma o locus (King y Stansfield, 1990).

### **3.1.6.3. Marcadores bioquímicos**

Las isoenzimas fueron las primeras proteínas usadas como marcadores moleculares en estudios de genética de plantas. En la actualidad siguen siendo una herramienta útil en la detección de variabilidad, por ser un método relativamente sencillo y económico para obtener información genética (Butcher *et al.*, 2000), y para estudios de gran escala de estructura poblacional y en relación con la resistencia a plagas y enfermedades (Forrest, 1994).

### **3.1.7. Marcadores moleculares utilizados en plantas**

Los marcadores moleculares se definen como cualquier molécula de proteína, RNA o DNA de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía. Se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del DNA entre individuos (Valadez y Kahl, 2000), además de detectar diferencias en pequeñas secuencias del DNA entre individuos. Diversas son las técnicas empleadas para ello y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998). Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muchas y en los últimos años se ha avanzado en busca de genes de interés, los cuales son de gran importancia en diversas áreas de estudio.

En agronomía se utilizan para realizar selección genotípica temprana en plántulas, evitando así manejar cientos o miles de plantas en la selección fenotípica en invernadero o campo, además de ser una herramienta en los planes de mejoramiento, ya que permiten acelerar la selección y disminuir los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas (Mauselli, 1999). También han ayudado a identificar características de resistencia a enfermedades, producción y calidad, y se han utilizado para estudios taxonómicos y filogenéticos de cultivos de importancia económica así como para la caracterización e identificación de genotipos (Phillips, 1998).



Dentro de los marcadores de DNA se encuentran los RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción), RAPD (Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico), AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados), y SSR (Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas) (Rallo *et al.*, 2002).

#### **3.1.7.1. RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción)**

La técnica de RFLP fue desarrollada en 1970. Inicialmente se utilizó para el mapeo físico de los endonucleasas (Grodzicker *et al.*, 1974) y para la construcción de mapas genéticos de ligamiento de restricción para humanos (Botstein *et al.*, 1980). En plantas fue utilizada por Phillips *et al.* (1995) y Valadez y Kahl (2000) para la caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos, pureza de semillas híbridas y selección de genes específicos de características agronómicas.

Los RFLP se comportan como marcadores codominantes, mientras que los marcadores morfológicos y los basados en PCR poseen alelos que interactúan de manera dominante o recesiva. La ventaja es que el nivel de variación alélica de los marcadores RFLP en poblaciones naturales de plantas es mayor que con los marcadores morfológicos (Helentjaris *et al.*, 1985). La técnica tiene numerosas aplicaciones aunque sus limitantes son el alto costo, la complejidad técnica y el amplio uso de radioisótopos de vida corta (Waugh y Powell, 1992). Es la técnica que más se ha utilizado para explorar diversidad genética a nivel nuclear, cloroplástica y mitocondrial en caña de azúcar (Canales *et al.*, 2003).

#### **3.1.7.2. Marcadores basados en la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Kary Mullis desarrolló una nueva técnica a mediados de los años 80 que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de DNA sin tener que clonarlo (Barrera *et al.*, 1993). Con esta técnica en un par de horas se consigue copiar millones de veces una secuencia predeterminada, dentro de una mezcla de DNA (Mullis, 1990).

En la actualidad la gran mayoría de los marcadores moleculares del DNA, se basan en la técnica del PCR (Phillips *et al.*, 1995), entre los que se encuentran los RADP, AFLP, Y SSR (Rallo *et al.*, 2002)

#### **3.1.7.2.1. RAPD (Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico)**

Descrita en 1990 (Williams *et al.*, 1990, Welsh y McClelland, 1990), utilizaron la misma metodología que la PCR, su modificación consistió en el uso de un iniciador, con la capacidad de unirse a muchos loci diferentes (Waugh y Powell, 1992), con lo que se consigue la ampliación de segmentos de DNA a través del uso de un iniciador de secuencias aleatorias o arbitrarias. En el análisis del PCR los dos iniciadores son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y en el análisis RAPD, el iniciador se usa para amplificar secuencias al azar de un patrón complejo de DNA (Phillips *et al.*, 1995).

La ventaja de los RAPD es la cantidad mínima de DNA necesaria para el análisis genotípico del individuo, pero su principal limitación es el bajo contenido de información genética por locus (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

#### **3.1.7.2.2. SSR (Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas)**

Los microsatélites se han utilizado cada vez más como marcadores moleculares. El polimorfismo ha demostrado alta eficiencia en numerosos estudios de plantas. Además, sus secuencias repetidas de DNA están presentes en organismos eucariontes (Morgante y Powell, 2002) y procariontes (Gur *et al.*, 2000). Son altamente polimórficos, generan gran volumen de información debido al número y frecuencia de los alelos detectados y presentan elevada repetitividad (Dávila *et al.*, 1999).

Son muy utilizados en la caracterización e identificación de germoplasma, su conservación y en la medida y monitoreo de la diversidad genética en agricultura. Los microsatélites se definen como regiones de secuencias pequeñas repetidas de DNA, generalmente de dos a tres nucleótidos, de uno a diez pares de bases repetidas y adyacentes distribuidas en el genoma (Mora *et al.*, 1995; Ciofi *et al.*, 1998).

Estas secuencias están dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden estar o no asociadas con genes. Además estas regiones

son altamente variables y útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Valadez y Kahl, 2000; Lowe *et al.*, 2004).

Se han utilizado en caña de azúcar, encontrando diversidad genética entre variedades (Nawshad *et al.*, 2005; Edmé *et al.*, 2006). También se ha utilizado con éxito para evaluar la diversidad genética en líneas puras de maíz (Enoki *et al.*, 2002), además de ser específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo (Vendramin *et al.*, 1996).

### **3.1.7.2.3. AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados)**

Es un tercer tipo de marcador que combina los RFLP y la PCR. Consiste en la amplificación de múltiples regiones arbitrarias del genoma (Vos *et al.*, 1995). Se les considera marcadores de alta eficiencia ya que permiten analizar un elevado número de loci a lo largo del genoma por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia. Además de ser en su mayoría dominantes y altamente reproducibles.

La desventaja de esta técnica es ser más complicada de ejecutar que los RAPD y el SSR, además de requerir una mayor cantidad de DNA (Vuylsteke *et al.*, 2000).

La técnica AFLP se ha utilizado con grandes éxitos para la obtención de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariontes y eucariontes, así como en plantas cultivadas que presentan una baja tasa de polimorfismo de DNA (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Es una buena fuente de información para análisis filogenéticos, y tiene la ventaja de que son dominantes, y usualmente no se conoce la localización cromosomal del patrón de fragmentos del DNA generado (Barrett y Kidwell, 1998). Esta técnica involucra cuatro etapas: a) el DNA genómico total del individuo es digerido por dos enzimas de restricción; b) acoplamiento de adaptadores específicos de doble cadena a los extremos de los fragmentos de restricción; c) amplificación selectiva de fragmentos con iniciadores específicos y; d) separación de los fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida (**Figura 1**) (Vos *et al.*, 1995).



rápido y más fácilmente (Becker *et al.*, 1995). Los marcadores AFLP también han sido utilizados para construir mapas genéticos en variedades de caña de azúcar comerciales (Aitken *et al.*, 2005; Reffay *et al.*, 2005). El polimorfismo se detecta por la presencia o ausencia de bandas debido a cortes en los sitios de restricción, o en las secuencias adyacentes al sitio de restricción, los cuales se complementan o se diferencian de los nucleótidos selectivos añadidos a los iniciadores del PCR, y por inserciones dentro del fragmento amplificado (Savelkoul *et al.*, 1999). Esta técnica también se ha utilizado en la detección y evaluación de la variación genética en colecciones de germoplasma y el estudio de la biodiversidad (Vuylsteke *et al.*, 2000).

### **3.1.8. Marcadores utilizados en caña de azúcar**

Las isoenzimas se han utilizado en caña de azúcar de clones micropropagados (RA 87-2, LCP 85-376 y LCP 85-384). Schugurensky y Díaz (2001) mostraron que el polimorfismo enzimático observado en esterasas y peroxidases determinó la existencia de diferencias entre los clones, pero no entre las plantas donantes y las micropropagadas provenientes de un mismo clon.

El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) se ha utilizado en caña de azúcar para estimar la diversidad genética de un grupo de clones para seleccionar progenitores (Canales *et al.*, 2003). Analizaron 45 genotipos de caña de azúcar y determinaron el polimorfismo en 35 combinaciones; de las 239 bandas identificadas, el 84.5% fueron polimórficas. Todas las sondas empleadas fueron polimórficas, siendo la combinación *EcoRI* – UMC114, la que permitió identificar el mayor número de genotipos.

Se ha hecho un análisis de la diversidad genética y filogenia en *Saccharum* y géneros afines utilizando marcadores RAPD. La diversidad molecular en el complejo *Saccharum* fue estudiada utilizando 195 marcadores generando 12 cebadores aleatorios. Entre las especies de *Saccharum*, *Saccharum officinarum* mostró un bajo nivel de diversidad genética, en comparación con *S. sinense* (Vijayan *et al.*, 1999).

Con los AFLP Besse *et al.* (1998) estudiaron la diversidad genética en una colección de germoplasma de caña de azúcar utilizando un análisis automatizado. El cálculo de coeficiente similitud y la agrupación manifestó una estructura genética de

*Saccharum* spp y *Erianthussecc ripidium* idéntica a la previamente obtenido mediante otros tipos de marcadores moleculares, mostrando la conveniencia de esta técnica.

Lima *et al.* (2002) estudiaron el análisis de similitud genética y el coeficiente de parentesco entre genotipos de caña de azúcar mediante la técnica AFLP (*Saccharum* spp). El estudio se hizo en un grupo de 79 cultivares de *Saccharum* spp (*Saccharum sinense*, *S. barberi* y dos de *S. officinarum*), el objetivo del estudio fue evaluar el grado de similitud genética entre la caña de azúcar, se hicieron 21 combinaciones para obtener los marcadores moleculares AFLP, generando un total de 2331 bandas, de los cuales 1121 fueron polimórficos, con una tasa de polimorfismo, en promedio, del 50% por combinación.

Otros estudios realizados mediante la técnica de AFLP han sido utilizados para el análisis de la organización filogenética y la diversidad genética en el complejo genoma de la caña de azúcar, *Saccharum* y *Erianthus*. Se avaluaron 30 clones pertenecientes a *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense* y los relacionados con el género *Erianthus*. Los AFLP dieron la resolución más alta de especies estrechamente emparentadas en grupos discretos, el nivel de diversidad intraespecífica de *Saccharum* fue mayor que los obtenidos anteriormente con el mismo conjunto de clones usando marcadores RAPD (Selvi *et al.*, 2006).

### **3.1.9. Filogenia de la caña de azúcar**

El género *Saccharum* se caracteriza por estar ampliamente distribuido en las zonas tropicales y subtropicales, aunque su origen es algo complejo. En la actualidad las especies de este género están definidas por citogenética y se han caracterizado a nivel morfológico (Daniels y Roach, 1987; Sreenivasan *et al.*, 1987), y a nivel ribosomal y de cloroplasto (Trevor *et al.*, 2002). Pero a pesar de numerosas investigaciones el origen y la taxonomía de la caña de azúcar es algo confuso (Irvine, 1999). A finales del siglo XVIII *Saccharum officinarum* representó al cultivo de la caña de azúcar por el alto contenido de sacarosa con la que contaba, pero su gran desventaja era su susceptibilidad a algunas enfermedades, y fue cuando a principios del siglo XIX, se iniciaron hibridaciones entre *S. officinarum* y especies silvestres, principalmente con *S. spontaneum*, ya que *S. spontaneum* se caracteriza por un bajo contenido de azúcar,

tallos finos y de alta fibra, y alta resistencia a factores bióticos y abióticos (Sreenivasan *et al.*, 1987).

### **3.1.9.1. DNA ribosómico**

El ribosoma de los eucariontes posee dos subunidades de DNA ribosomal (rDNA). La subunidad mayor tiene un RNA de 28S, otro de 5.8S y 5S. La subunidad menor tiene un RNA de 18S, separados por las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer).

El ITS se encuentra repetidamente entre los genes del RNA ribosomal de la subunidad mayor y menor del DNA nuclear, además de ser un área de alta variabilidad, lo que permite diferenciar individuos relacionados genéticamente (Atkins y Clark, 2004). En la actualidad es uno de los fragmentos más amplificados para establecer relaciones filogenéticas entre plantas y hongos. La utilidad del rDNA nuclear en el análisis filogenético radica en su incidencia para repetir en tándem varios o cientos de copias por genoma, lo que permite fácil acceso y amplificación por PCR (White *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1991).

### **3.1.9.2. DNA cloroplástico**

Las diferentes regiones del DNA cloroplástico son ampliamente utilizadas en estudios filogenéticos a nivel interespecífico e intraespecífico debido a su alta tasa evolutiva (Tabarlet *et al.*, 1991; Giell y Tabarlet, 1994; Small *et al.*, 1998).

Las regiones de cloroplastos *trnL-F* se han estudiado en numerosos grupos de especies entre ellas la caña de azúcar (Hodkinson *et al.*, 2002). Para la amplificación de esta región se han realizado secuencias de iniciadores a partir de regiones conservadas de los genes *tRNA*. En los estudios que se han hecho en diferentes grupos de plantas al utilizar estos iniciadores se obtuvieron excelentes amplificaciones en las siguientes especies: *Acrocladium cuspidulum* (Amblystegiaceae), *Lunularia cruciata* (Lunulariaceae), *Thelypteris palustris* (Thelypteridaceae), *Equisetum arvense* (Equisetaceae), Gymnosperma: *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), *Pinus nigra* (Abietaceae), Angiosperms: *Magnolia* sp. (Magnoliaceae), *Aconitum* Sp. (Ranunculaceae), y *Phalaris arundinaceae* (Poaceae) (Tabarlet *et al.*, 1991).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

#### 4.1.1. Localización

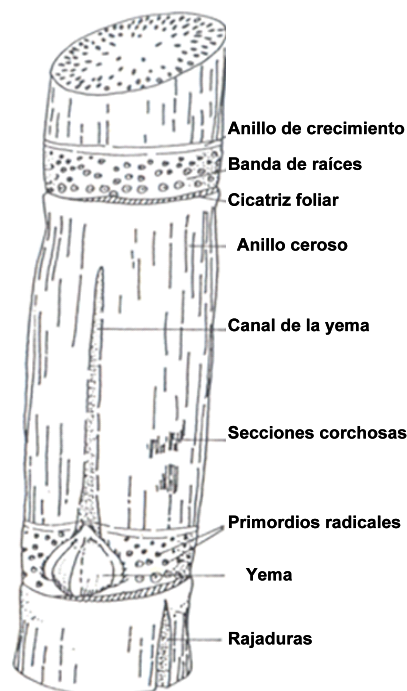
La descripción fenotípica se llevó a cabo en el banco de variedades del Campo Experimental Km 21 del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, ubicado en la carretera Circuito del Golfo Cárdenas-Coatzacoalcos a 18°N 93°33'. El banco fue establecido en 1994 (Valdez, 1994).

#### 4.1.2. Descriptores fenotípicos

La descripción fenotípica se basó en la metodología descrita por Skinner (1971); Rodríguez y González (1984). Las 12 variedades de caña de azúcar se describieron a los nueve meses de edad considerando las características siguientes:

##### 4.1.2. 1. Entrenudo

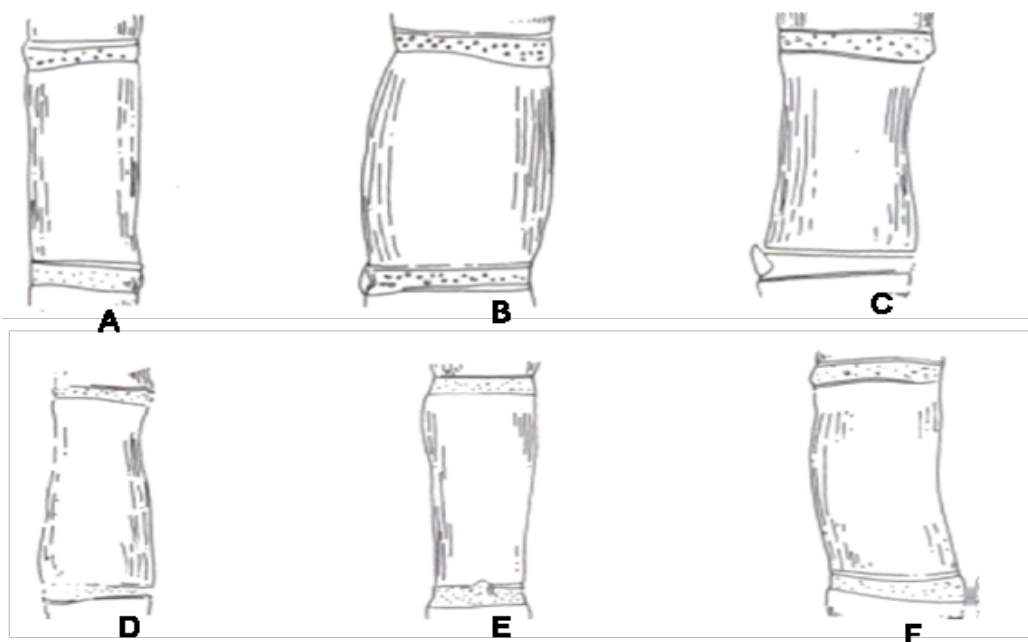
El tallo de la caña de azúcar está compuesto por una serie de unidades relativamente independientes que se denominan entrenudos (**Figura 2**)



**Figura 2.** Esquema de un entrenudo.



**Forma.** En el aspecto longitudinal se tomaron en consideración las formas mostradas en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Aspecto longitudinal de tallos de caña de azúcar: A) cilíndrica; B) Abarrilado; C) En forma de huso; D) Conoidal; E) Obconoidal; F) Cóncavo convexo.

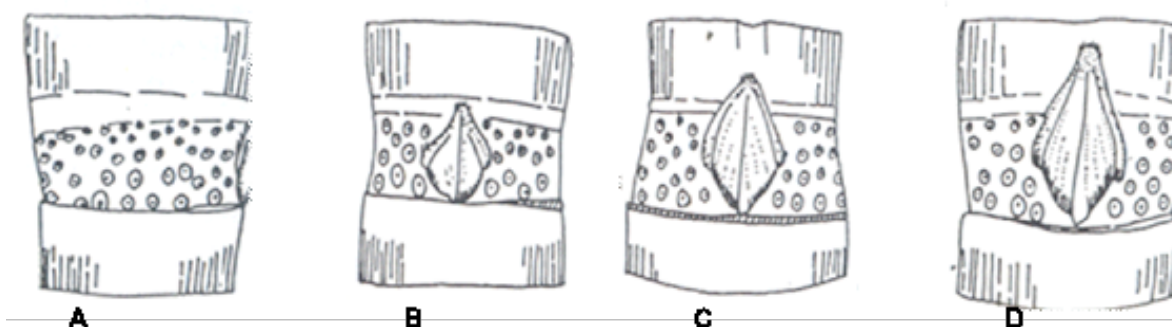
**Color.** Se determinó desprendiendo manualmente la vaina de la hoja que cubre el entrenudo inmediato a la parte del tallo que ha despajado naturalmente, contrastando este color con la de la parte expuesta al sol.

Las tonalidades van del amarillo, verde y morado, y combinaciones como por ejemplo: amarillo-verdosa, verde amarillento, verde-crema, morado-verdoso.

**Canal de la yema.** Es una depresión en el entrenudo que nace en la parte superior de la yema, puede ser ancha o angosta, profunda o ligera, larga o corta, en ocasiones desaparece y en muchas variedades no se presenta.

**Banda de raíces.** Morfológicamente está situada en la parte basal del entrenudo, en la que se encuentran la yema y varias hileras de primordios radicales.

Por su forma se puede clasificar como se ilustra en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Bandas de raíces de entrenudos de caña de azúcar: A) Cilíndrica; B) Abobinada; C) Cónica; D) Obcónica.

**Fisuras acorchadas.** La superficie del entrenudo es generalmente lisa. Algunas variedades presentan fisuras acorchadas que son pequeños surcos que le dan un aspecto rugoso.

**Grietas.** En la corteza se presentan agrietamientos de diferente anchura y profundidad, los cuales pueden ser cancelados o quedar abiertos como posible entrada de patógenos. Se indicaron las especificaciones mencionadas y los tercios del tallo donde se localizan.

#### 4.1.2.2. Yema

**Posición en el entrenudo.** Se encuentra en la banda radical, inmediatamente arriba de la cicatriz foliar, despegadas o muy cercanas a ella.

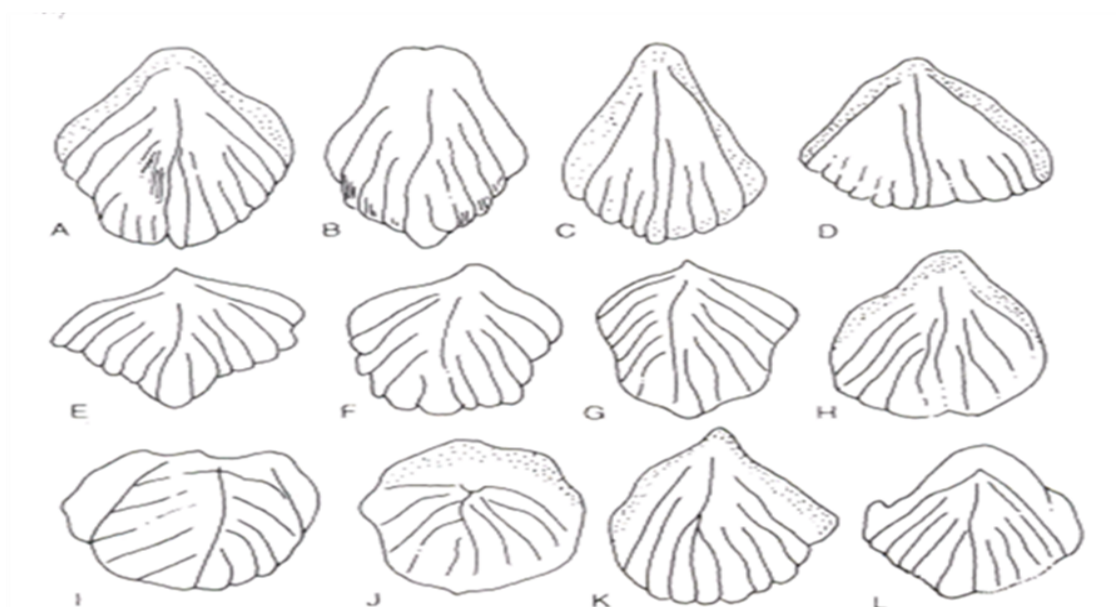
Se anotó la posición haciendo énfasis en la posición basal de la yema en relación a la cicatriz foliar.

**Forma:** color, presencia de alas y pubescencia. En las yemas maduras el color se parece al del entrenudo; se anotó de acuerdo a lo especificado en el color del

entrenado. La parte visible de la yema está compuesta de un disco central o costillas y el ala.

El límite entre la costilla y el ala llamada articulación, no siempre se nota y en algunas variedades que tienen alas angostas; con frecuencia las costillas se confunden con las alas. El ala es una membrana de ancho uniforme y existen variedades que tienen el ala más ancha en la base y lóbulos irregulares que en ocasiones alcanzan buen tamaño y forman un ala secundaria. Las yemas de algunas variedades presentan pocos tricomas mientras que otras los presentan en abundancia.

Para registrar esta variable se anotó la presencia y cantidad de vello en la yema, el color de la misma y la forma de acuerdo a la que correspondía con base a los patrones de yema de la **Figura 5**.



**Figura 5.** Forma más comunes de la yema en caña de azúcar: A) Ovoide; B) Ovoide angosta; C) Deltoide larga; D) Deltoide corta; E) Romboide; F) Pentagonal; G) Pentagonal con alas en la parte superior; H) Ovoide angosta con alas prominentes en la parte superior; I) Redonda con alas laterales; J) Redonda con poro germinal central; K) Ovoide con alas pronunciadas; L) Ovoide con alas secundarias.

**Tipo y tamaño.** Pueden ser grandes, medianas y pequeñas, en cuanto a tamaño, y en cuanto a tipo plana o abultada. Estas características se determinaran en forma visual.

### 4.1.2.3. Hoja

Las hojas en el tallo se presentan en dos hileras sobre lados opuestos en forma alterna una por nudo. Conforme se van desarrollando las hojas nuevas, las más viejas se van desprendiendo de tal forma que el número permanece generalmente constante a través de la vida de la planta.

La hoja está compuesta por la lámina y la vaina; donde se unen, se forma la articulación de la hoja con tejidos especializados; en la base de la vaina donde la hoja se une al tallo, se forma una protuberancia denominada nudo o base de la vaina.

#### Lámina

- a) Conformación. La lámina de la hoja puede ser erecta con el ápice curvado o arqueada.
- b) Color. Se anotó el color de la lámina que puede variar del verde pálido al verde oscuro.

**Vaina.** La vaina de las hojas está inserta en el nudo y forma un tubo abierto cuyos extremos se traslapan.

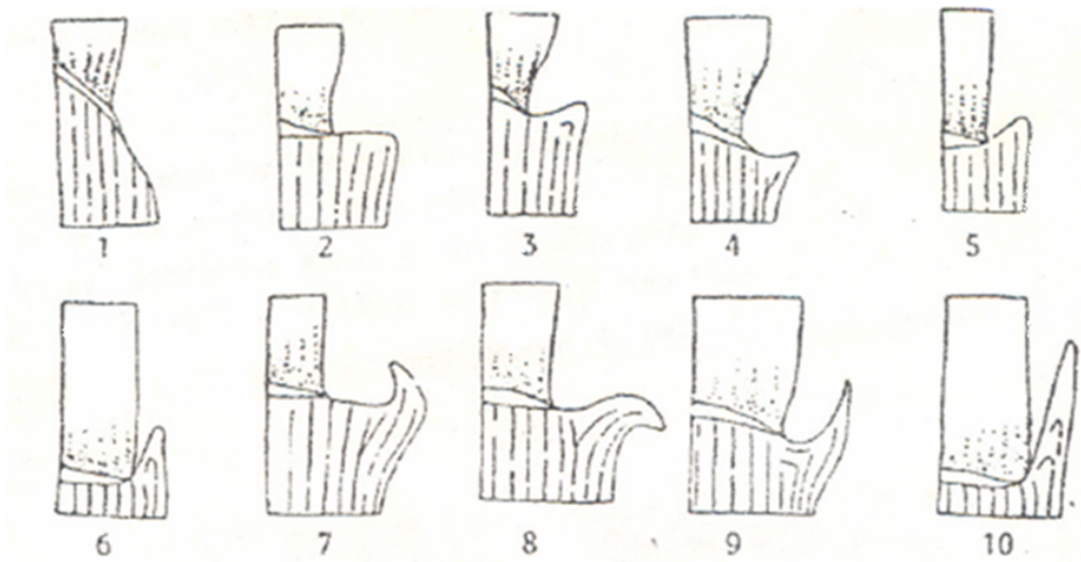
- a) Cera. Los depósitos de cera pueden ser delgados o gruesos.
- b) Pubescencia. En algunas variedades la vaina es lisa y en otras presenta abundantes ahuates, que se pueden presentar en agrupaciones más o menos definidas. La determinación de esta característica se efectuó de acuerdo a la **Figura 6**.



**Figura 6.** Características de la lámina o vaina de la hoja de la caña de azúcar: 1) Ausencia; 2) Escasos; 3) Regular; 4) Cuantiosos.

**Aurículas.** Son apéndices asimétricos de la vaina de la hoja.

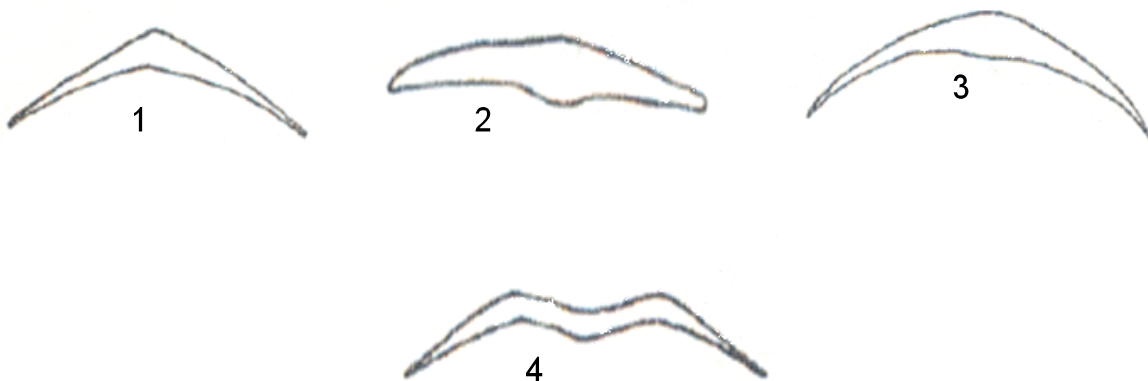
Tipo de aurícula. El tipo de aurícula se determinó de acuerdo a la **Figura 7**.



**Figura 7.** Tipos de aurículas en caña de azúcar: 1) Transitoria oblicua; 2) Transitoria horizontal; 3) Transitoria ascendente; 4) Dental; 5) Deltoides; 6) Lanceolada corta; 7) Abultada; 8) Espoloneada; 9) Aguda; 10) Lanceolada.

**Pubescencia.** Se pueden presentar tricomas entre la aurícula y la lámina que son características de la variedad. Se anotó su presencia de ver el caso.

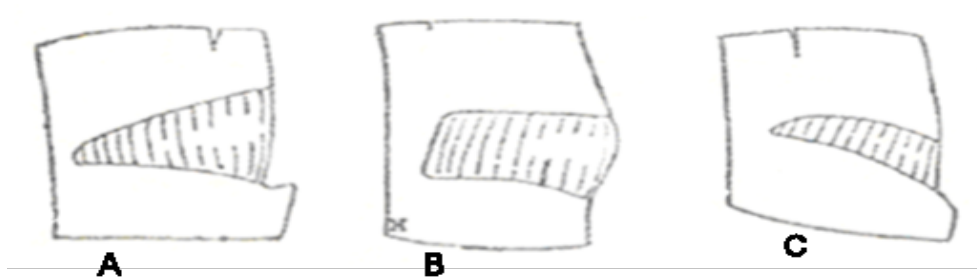
**Lígula.** Es un apéndice membranoso situado en la unión interna de la vaina y la lámina de la hoja. Se reconocen cuatro tipos de lígula (**Figura 8**).



**Figura 8.** Tipos de lígula de caña de azúcar: 1) Deltoide; 2) Lineal; 3) Creciente; 4) Arco.

**Collar.** Es la parte externa de la unión de la lámina y la hoja, la parte interna donde se encuentra la lígula se denomina cuello.

**Forma.** Se presentan tres formas básicas de collar (**Figura 9**)



**Figura 9.** Tipos de collar de caña de azúcar: A) Deltoides; B) Rectangular; C) Ligular.

**Color.** Conforme la hoja madura, el collar adquiere un color verde aceituna, verde-cafesoso o más oscuro.

## 4.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GÉNERO *Saccharum*

### 4.2.1. Variedades de caña de azúcar.

Se utilizaron 12 variedades de caña de azúcar (**Cuadro 1**). De las variedades se tomaron hojas jóvenes de plantas en campo de acuerdo a la metodología recomendada por el protocolo del laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT (2006).

**Cuadro 1.** Variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco, utilizadas en este estudio.

Variedad	Progenitores	País de origen
C 87-51	Co 281 x POJ 2878	Cuba
Mex 57-1285	CP 52-43 X CB 45-6	México
Mex 59-32	B 35-187 x CP 34-120	México
Mex 91-130	Mex 57-280 x Mex 72-161	México
ATM 96-40	SP 70-6180 x Mex 79-431	México
RD 75-11	CB 38-22 X CP 57-603	República Dominicana
Mex 79-431	Co 421 x Mex 57-473	México
B 4362	B 37-161 x POJ 2878	Barbados
Mex 69-290	Mex 56-476 x Mex 53-142	México
SP 70-1284	CB 41-76 X ?	Brasil
CP 72-2086	CP 62-374 x CP 63-588	Estados Unidos
Mex 68-P-23	Mex 59-84 x ?	México

### 4.2.2. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA se empleó el método descrito por Baindridge *et al.*, (1990). El cual consiste en macerar 5g de hoja jóvenes con nitrógeno líquido y transferirlos a tubos eppendorf de 2.0 ml, agregándole 600 µL de la solución de lisis (10 mM Tris-base-HCl pH 8.0, 250 mM EDTA 2H<sub>2</sub>O pH 8.0, Proteinaza K (Sigma) 200 µg MI<sup>-1</sup>, Triton x 100, 0.5%). Se incubó a 37°C hasta el día siguiente, posteriormente se agregaron 150 µL de NaCl (1.5 M), 700 µL de fenol equilibrado y 300 µL de cloroformo, se

centrífugo a 10500 rpm durante 10 minutos, la fase acuosa se transfirió a otro tubo al cual se le agregó 1 ml de cloroformo, se centrífugo a 10500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 600  $\mu\text{L}$  de etanol, dejándose reposar hasta el día siguiente a 4°C, se centrífugo a 10500 rpm durante 20 minutos, se dejó secar la pastilla por 30 minutos a 37°C por inversión de los tubos. Se resuspendió el DNA en 80  $\mu\text{L}$  de TE pH 8.0 (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA pH 8.0).

Para visualizar el DNA se separaron fragmentos por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 75 volts durante 45 min.

Se determinó la concentración de DNA mediante la lectura por el método de espectrometría y se igualaron las concentraciones de todas las muestras a 100  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ .

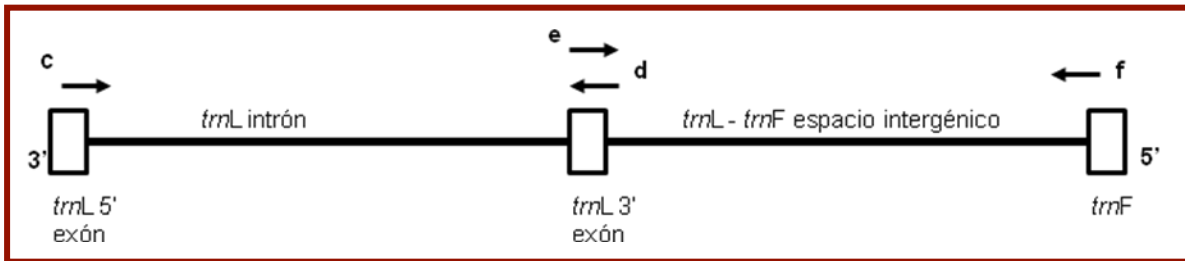
#### **4.2.3. Amplificación mediante ITS (Internal Transcribed Spacer)**

Para las amplificaciones de las regiones ITS del rDNA se utilizaron los iniciadores *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e *ITS5* (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). Se hizo una mezcla de 5X de reacción Buffer (5  $\mu\text{l}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (2.0  $\mu\text{l}$ ), dNTP 1 mM (2.0  $\mu\text{l}$ ), agua (6.6  $\mu\text{l}$ ), Taq DNA polimerasa (0.4  $\mu\text{l}$ ) y DNA genómico (1.5  $\mu\text{l}$ ) para un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  y se incubó en termociclador (Bio – Rad) utilizando 35 ciclos a 94 °C por 2 min, 36 ciclos 94°C por 1 min, 65°C por 1 min, 72°C por 1 min, 37 ciclos 72°C 5 por 1 min, y 38 ciclos 40°C por 1 min.

#### **4.2.4. Amplificación mediante iniciadores *trnL-F***

Para la amplificación del DNA de cloroplasto se utilizaron los iniciadores universales *trnL-F* propuesto por Taberlet *et al.* (1991), para estudiar la relación filogenética en *Saccharum officinarum* ya que esta región es más variable que otros loci cloroplasto (**Figura 10**). Se hizo una mezcla de 5X de reacción Buffer (5  $\mu\text{l}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (2.0  $\mu\text{l}$ ) iniciador 1 (*trnLF*), iniciador 2 (*tmLC*), dNTP 1 mM (2.0  $\mu\text{l}$ ), agua (7.5  $\mu\text{l}$ ), Taq DNA polimerasa (0.5  $\mu\text{l}$ ) y DNA genómico (1.5  $\mu\text{l}$ ) para un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  y se incubó en termociclador (Bio – Rad), utilizando 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 50- 56 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, con sus secuencias (**Cuadro 2**).



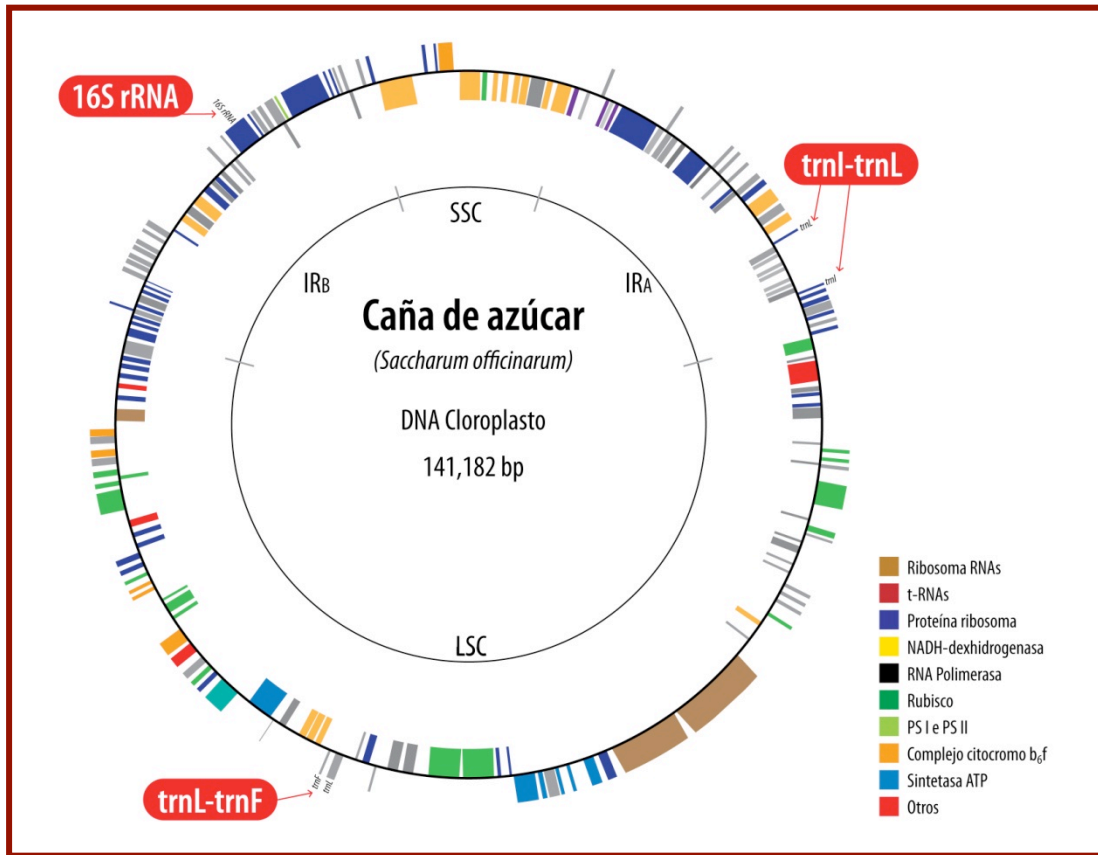


**Figura 10.** Ubicación aproximada de iniciadores *trnL-F* (Taberlet *et al.*, 1991).

**Cuadro 2.** Secuencia de los iniciadores *trnL-F* utilizados en el estudio.

Nombre	Secuencia
a	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
f	ATTTGAACTGGTGACACGAG

La zona elegida del DNA de cloroplasto para el estudio en variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco fue la comprendida entre los genes *trnL-F* (**Figura 11**). Estas zonas han sido utilizadas ampliamente para la realización de estudios filogenéticos en diversas especies, y además codifica el tRNA de la leucina (*trnL*) y el tRNA de la fenilalanina (*trnF*), cuenta con varios cientos de bases de DNA no codificante entre estos genes y dentro del intrón del gen *trnL* (Taberlet *et al.*, 1991).



**Figura 11.** Localización de los genes *trnL-F* en el genoma del cloroplasto de *Sacharum officinarum*.

#### 4.2.3. Alineamiento de secuencias

Las muestras obtenidas de PCR fueron secuenciadas en Macrogen Inc en Seoul, Korea. Para realizar el alineamiento de secuencias se utilizó el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) y alineadas con las secuencias depositadas en las bases del National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Después de realizar los alineamientos se elaboró el árbol filogenético con los programas MEGA y Mr. Bayes (Bayesian Analysis of Phylogeny) versión 3.1.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA TÉCNICA AFLP

El procedimiento para la realización de los AFLPs, se realizó siguiendo las recomendaciones indicadas en el Kit AFLP® *Analysis System I* y AFLP® *Starter Primer Kit* (Invitrogen™, Carlsbad, CA).

#### 4.3.1. Digestión genómica del DNA

El DNA genómico fue digerido usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*. Se hizo una mezcla de 5X de reacción Buffer (5 µl), DNA control de tomate (100 ng en 5 µl (2.5 µl), muestra DNA (250 ng en 18 µl), *EcoRI/MseI* (2 µl), agua destilada (15.5 µl) para un volumen final de 25 µl. Se encubó a 37°C por 2 h.

#### 4.3.2. Ligación de adaptadores

Para la ligación se hizo una dilución 1:5, con 24 µl de adaptadores solución de la ligación y 1 µl de T4 DNA ligasa para un volumen final de 25 µl.

#### 4.3.3. Pre - amplificación

La pre-amplificación se realizó con una dilución 1:10 de la mezcla Primer Mix (40 µl), 10 X PCR buffer plus Mg (5.0 µl), *Taq* DNA polimerasa (1 µl) (**Cuadro 3**). La solución resultante fue llevada a un termociclador DNA (Engine Peltier Thermal Cycler de Bio-Rad), previamente programado para 20 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. De la pre amplificación se prepararon diluciones 1:10 con agua para AFLP (Sigma).

**Cuadro 3.** Reactivos usados en la pre-amplificación en caña de azúcar

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (µl)</b>
DNA (1:10, de ligación)	5.0
Mezcla de primer de pre-amplificación	40.0
Buffer de PCR 10X con Mg	5.0
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U. µl <sup>-1</sup> )	1.0
<b>Volumen total</b>	<b>51.0</b>

#### 4.3.4. Amplificación selectiva

De acuerdo a las recomendaciones del fabricante se buscaron posibles combinaciones para encontrar las que dieran mejor patrón de bandeo y así poder diferenciar las 12 variedades de caña de azúcar (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Combinaciones de iniciadores en caña de azúcar

No. Combinaciones	Combinación de iniciadores <i>EcoR I/Mse I</i>
1	E-AAC/M-CAC
2	E-AAG/M-CTC
3	E-ACA/M-CTT
4	E-ACC/M-CTA
5	E-AAC/M-CAG
6	E-AAC/M-CTG
7	E-ACC/M-CTG
8	E-ACG/M-CAC
9	E-ACG/M-CAA
10	E-ACT/M-CTC
11	E-AGC/M-CAT
12	E-AGG/M-CAT

Se realizaron dos mezclas. La primera se hizo con 0.5  $\mu$ l para el iniciador *EcoRI* y para el iniciador *MseI* se utilizaron 4.5  $\mu$ l. Para la segunda mezcla se tomaron 5  $\mu$ l de una dilución 1:10 del resultado de la primera amplificación con H<sub>2</sub>O destilada (7.9  $\mu$ l), 10 X PCR buffer plus Mg (2.0  $\mu$ l), *Taq* DNA polimerasa (0.1  $\mu$ l) (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5.** Reactivos usados en la amplificación selectiva de caña de azúcar

Mezclas	Componente	Volumen ( $\mu$ l)
Mezcla 1	Iniciador <i>EcoR I</i>	0.5
	Iniciador <i>Mse I</i> (contiene dNTPs)	4.5
	<b>Volumen total</b>	<b>5.0</b>
Mezcla 2	Agua destilada H <sub>2</sub> O	7.9
	Amortiguador para PCR 10X con Mg	2.0
	<i>Taq</i> polimerasa (5 U $\mu$ l <sup>-1</sup> )	0.1
	<b>Volumen total</b>	<b>10.0</b>
Final	DNA molde (pre-amplificación 1:10)	5.0
	Mezcla 1	5.0
	Mezcla 2	10.0
	<b>Volumen total</b>	<b>20.0</b>

La mezcla final fue incubada en el termociclador DNA (Engine Peltier Thermal Cycler de Bio-Rad), previamente programado para un ciclo a 94°C 30 s, 65°C por 30 s y 72°C por 60 s, con un gradiente de 0.7 °C por ciclo; 33 ciclos a 95 °C 30 segundos, 56 °C 30 segundos y 72 °C por 1 min con un gradiente de -0.7 °C por 13 ciclos; 23 ciclos a 94 °C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1 min.

Finalmente se separaron fragmentos de DNA por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 16%, seguido de una tinción con plata, a 250 volts durante 3 h.

#### **4.3.5. Análisis estadístico**

A partir de los patrones electroforéticos obtenidos de las pruebas moleculares se evaluaron las bandas de forma binaria considerando el valor 0 como ausencia y 1 como presencia. A partir de las matrices de los datos originales, se calculó el coeficiente de similitud genética entre cada par de genotipo, utilizando solo las bandas polimórficas, mediante el paquete estadístico NTSys PC. 2.0 (dendrograma y matriz de distancia genéticas).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN




### 5.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La descripción fenotípica de las 12 variedades de caña de azúcar estudiadas se presenta en los cuadros 6 a 17 presentando las principales características de entrenudo, yema y hoja.


**Cuadro 6.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad C 87-51

Descripción		
Entrenudo	Forma: cilíndrica, color morado cuando está expuesta al sol y presenta una coloración crema con tintes morados cuando está cubierta por la vaina.	
Yema	Forma: ovoide, la posición en el entrenudo es despegada de la cicatriz foliar y toca ligeramente el anillo de crecimiento, el color es crema con tintes rojizos, no presenta pubescencia y sus alas son pequeñas.	
Hoja	La conformación de la lámina es erecta con el ápice curvado, color verde oscuro, el color de la vaina es aceituna, con cera abundante y poca pubescencia. La forma de la aurícula es transitoria ascendente la interna y dental la externa.	

**Cuadro 7.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad Mex 57-1285




Descripción		
Entrenudo	Forma: cóncavo-convexo, el color es verde cremoso, expuesto al sol tiene tintes morados, cubierto por la vaina presenta tintes cafés, con capa de cera gruesa queda la apariencia de encalado, no presenta canal de yema.	
Yema	Forma: redonda con alas pegadas, las bandas de raíces son altas, con pocas hileras de raíces, el anillo de crecimiento es ligeramente rojizo en el lado opuesto a la yema, la posición en el entrenudo de la yema es despegado de la cicatriz foliar y toca el anillo de crecimiento ligeramente, presenta una callosidad, de tipo y tamaño media abultada.	
Hoja	La conformación de la lámina es erecta con el ápice curvado, color de la vaina es verde claro, cera regular, no presenta pubescencia, la aurícula es deltoide, la interna y la externa es transitoria ascendente. La lígula es deltoide.	

**Cuadro 8.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad Mex 59-32




Descripción		
Entrenudo	Forma: abarrilado, el color cuando está expuesta al sol es morado y cubierta por la vaina es verde, cera delgada.	
Yema	Forma: ovoide, con tintes de color morado en los ápices de las alas y pubescencia escasa.	
Hoja	La conformación de la lámina es arquada, color verde claro. El tipo de aurícula la interna es aguda y la externa transitoria oblicua. Lígula tipo deltoide, collar de forma regular verde claro, la conformación de la copa es deltoides. Las bandas de raíces son obcónica.	






**Cuadro 9.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad Mex 91-130

Descripción		
Entrenudo	Forma: cilíndrica, color de tallos amarillo de con tintes verdes cuando está expuesta al sol y crema cuando esta cubierta por la vaina, hábito de crecimiento erecto.	
Yema	Forma: deltoide larga, rebasa el anillo de crecimiento.	
Hoja	La conformación de la lámina es erecta con el ápice curvado, color verde claro. El tipo de aurícula la interna es espolonciada y la externa transitoria horizontal.	




**Cuadro 10.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad ATM 96-40

<b>Descripción</b>		
Entrenudo	Forma: cilíndrica, el tallo es verde claro cuando está cubierto por la vaina verde con tintes morados con capa gruesa de cera, el hábito de crecimiento es erecto.	
Yema	Forma: deltoide corta, no rebasa el anillo de crecimiento.	
Hoja	La conformación de la lámina es erecta con el ápice curvado, color verde oscuro. La aurícula la interna es lanceolada corta, y la externa transitoria oblicua.	




**Cuadro 11.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad RD 75-11

<b>Descripción</b>		
Entrenudo	<p>Forma: cilíndrica, tallo inclinado, sólido, color verde amarillento cuando está expuesto al sol y color verde crema cuando está cubierto por la vaina; con escasa cantidad de cera, de corteza blanda; regular despaje, no presenta canal de la yema, cicatriz foliar oblicua, anillo de crecimiento ligeramente abultado amarillo, presenta grietas de crecimiento en los tercios inferiores y medio del tallo, su forma es ligera a profunda a todo lo largo del entrenudo.</p>	
Yema	<p>Forma: redonda con poro germinal central, y alas cortas, despegada de la cicatriz foliar y toca ligeramente el anillo de crecimiento.</p>	
Hoja	<p>La conformación de la lámina es erecta con el ápice curvado, color verde claro. Hoja ancha, color verde pálido; vaina color verde crema con escasa cantidad de ahuates. La aurícula interna espolonciada y la externa transitoria horizontal. Lígula creciente, collar ligular color verde aceituna, banda de raíces obcónica, copa tamaño grande.</p>	




**Cuadro 12.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad Mex 79-431

<b>Descripción</b>		
Entrenudo	Forma: cilíndrica, el tallo es verde claro cuando está cubierta por la vaina verde amarillento cuando, está expuesto al sol, el habito de crecimiento es oblongo.	
Yema	Forma: abultada en forma pentagonal.	
Hoja	La conformación de la lámina es arqueada, color verde claro, de anchura media. La aurícula la interna es lanceolada corta, y la externa transitoria oblicua.	




**Cuadro 13.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad B 4362

<b>Descripción</b>		
Entrenudo	<p>Forma: cóncavo-convexo, con fisura acorchada, color verde amarillento cuando está expuesto al sol y cubierto por la vaina es de color verde pálido, cubierto totalmente de cera delgada, canal de la yema incipiente, ligero, corto y angosto, el anillo de crecimiento presenta una coloración amarillenta clara y rojiza en el lado opuesto de la yema, presenta grietas de crecimiento muy ligeras.</p>	
Yema	<p>Forma: ovoide, no presenta alas, ni pubescencia, de tamaño mediano.</p>	
Hoja	<p>La conformación de la lámina es erecta con el ápice curvado, color verde claro, el color de la vaina es verde amarillento con pubescencia regular. La aurícula la interna es lanceolada y la externa transitoria ascendente. Lígula creciente, collar deltoides, el tamaño de la copa es mediano.</p>	




**Cuadro 14.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad Mex 69-290

Descripción		
Entrenudo	Forma: cilíndrica, color verde crema cuando están cubiertos por la vaina de la hoja y verde claro cuando están expuestos al sol, la suavidad de la corteza es regular, tallo moledero.	
Yema	Forma: ovoide, con poca frecuencia toca el anillo de crecimiento, en ocasiones presenta yemas dobles asimétricas.	
Hoja	La conformación de la lámina es arqueada, color verde claro. La aurícula la interna es lanceolada y la externa transitoria ascendente.	

**Cuadro 15.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad SP 70-1284




<b>Descripción</b>		
Entrenudo	<p>Forma: cilíndrica, color verde amarillento cuando está cubierta por la vaina y verde claro cuando está expuesta al sol presenta tintes morados, cera regular.</p>	
Yema	<p>Forma: ovoide, con el canal de la yema ancho, ligero y largo, no presenta fisuras acorchadas, el anillo de crecimiento es amarillo abultado.</p>	
Hoja	<p>La conformación de la hoja es erecta, color verde claro, con cera escasa y pubescencia regular. El tipo de aurícula es la interna lanceolada corta y la externa es transitoria horizontal, solo presenta pubescencia en aurículas tiernas. Las bandas de raíces cilíndricas.</p>	

**Cuadro 16.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad CP 72-2086

<b>Descripción</b>		
Entrenudo	Forma: cilíndrica, el tallo es verde amarillento cuando está expuesta al sol, y verde crema cuando está cubierta por la vaina, el hábito de crecimiento inclinado.	
Yema	Forma: ovoide, no llega al anillo de crecimiento.	
Hoja	La conformación de la lámina es arqueada, color verde claro. La aurícula la interna es lanceolada corta, y la externa transitoria horizontal.	



**Cuadro 17.** Descripción del entrenudo, yema y hoja de la variedad Mex 68-P-23

<b>Descripción</b>		
Entrenudo	<p>Forma: cilíndrica, color verde-amarillento cuando está expuesta al sol y verde crema cuando está cubierta por la vaina, cera regular, no presenta canal de yema, las bandas de raíces son obcónicas, con fisuras acorchadas escasas, el anillo de crecimiento es verde amarillento ligeramente abultado, grietas de crecimiento regular en el primer tercio.</p>	
Yema	<p>Forma: redonda con alas laterales, despegada de la cicatriz foliar y no llega al anillo de crecimiento, con pubescencia de alas escasas.</p>	
Hoja	<p>La conformación de la lámina es arqueada de color verde oscuro, cera escasa y poca pubescencia. El tipo de aurícula es lanceolada corta la interna y la externa transitoria horizontal, solo presenta pubescencia escasa en aurículas tiernas, el tipo de lígula es creciente, la forma del collar es ligular, color verde cafésoso.</p>	

Al agrupar a las 12 variedades de caña de azúcar conforme al tipo de entrenudo se encontró que las variedades se reparten bien en tres grupos. El grupo I lo comprendió las variedades C 87-51, Mex 91-130, ATM 96-40, RD 75-11, Mex 79-431, SP 70-1284, CP 72-2086, Mex 69-290 y Mex 68-P-23 presentaron forma cilíndrica. El grupo II lo integró las variedades Mex 57-1285 y B 4362 quienes presentaron forma cóncavo-convexo y en el grupo III lo conformó la variedad Mex 59-32 quien presentó forma abarillado.

Otra característica fenotípica importante es la forma de la yema quien presento seis formas diferentes en las variedades C 87-51, Mex 59-32, B 4362, SP 70-1284, Mex 69-290 y CP 72-2086, es ovoide, las variedades Mex 57-1285 y Mex 68-P-23 presentaron forma redonda con alas laterales, la variedad Mex 91-130 presentó forma deltoide larga y la variedad ATM 96-40 presentó deltoide corta, la variedad RD 75-11 su forma es redonda con poro germinal central y la variedad Mex 79-431 presentó forma pentagonal.

En la conformación de la hoja predomino la forma erecta con el ápice curvado en las variedades C 87-51, Mex 57-1285, Mex 91-130, RD 75-11, ATM 96-40, B 4362 y SP 70-1284. Las variedades Mex 79-431, Mex 59-32, Mex 69-290, CP 72-2086 y Mex 68-P-23 presentaron forma arqueada.

El tipo de aurícula externa para las variedades Mex 91-130, RD 75-11, SP 70-1284, CP 72-2086 y Mex 68-P-23 es transitoria horizontal, las variedades Mex 57-1285, B 4362 y Mex 69-290 es transitoria ascendente, las variedades ATM 96-40, Mex 79-431 y Mex 59-32 el tipo de aurícula es transitoria oblicua, solo la variedad C 87-51 tiene forma dental.

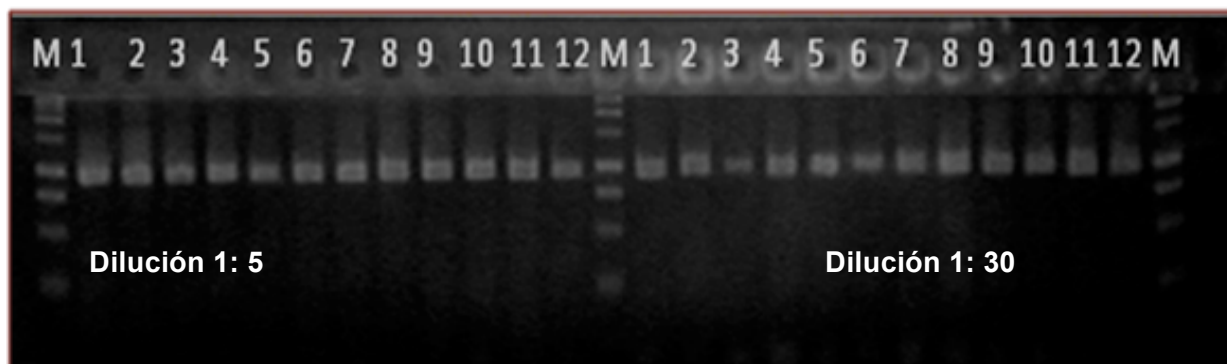
En lo que respecta el color del tallo esta no es una característica que se comporte de manera estable los colores variaron cuando están expuestos al sol y cuando están cubiertas por la vaina. Por ejemplo la variedad, C 87-51 y Mex 59-32 presentaron color morado cuando están expuestas al sol, pero cuando están cubiertas por las vainas su color fue diferente para ambas. Las variedades RD 75-11, Mex 79-431, B 4362, SP 70-1284, CP 72-2086 y MEX 68-P-23 todas presentaron color verde amarillento cuando están expuestos al sol pero su color vario al estar cubiertos por la vaina. Las variedades Mex 57-1285, Mex 91-130 y ATM 96-40 presentaron diferencias

en el color cuando están expuestos al sol y así como, cuando están cubiertas por la vaina. (**Cuadro 7, 9 y 10**). Esto coincide con lo descrito por Yang y Baker. (1991); Magari y Kang. (1993) quienes mencionan que las diferencias fenotípicas pueden estar afectadas por el ambiente y puede deberse a como influye cada genotipos desde un ambiente, lo que permite excluir al color del tallo como variable fenotípica.

## 5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GÉNERO *Saccharum*

### 5.2.1 Amplificación de la región *trnL-F* de cloroplasto

Como resultado de la amplificación de la región *trnL-F* de cloroplasto de las 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco se encontró que tienen aproximadamente 400 pares de bases (bp) (**Figura 12**). Estas regiones de cloroplastos han sido utilizadas ampliamente para la realización de estudios filogenéticos en numerosos grupos de especies de plantas entre ellas la caña de azúcar (Hodkinson *et al.*, 2002), por codificar el tRNA de la leucina (*trnL*) y el tRNA de la fenilalanina (*trnF*) y contar con varias cientos de bases de DNA no codificante entre estos genes y dentro del intrón del gen *trnL* (Tabarlet *et al.*, 1991).

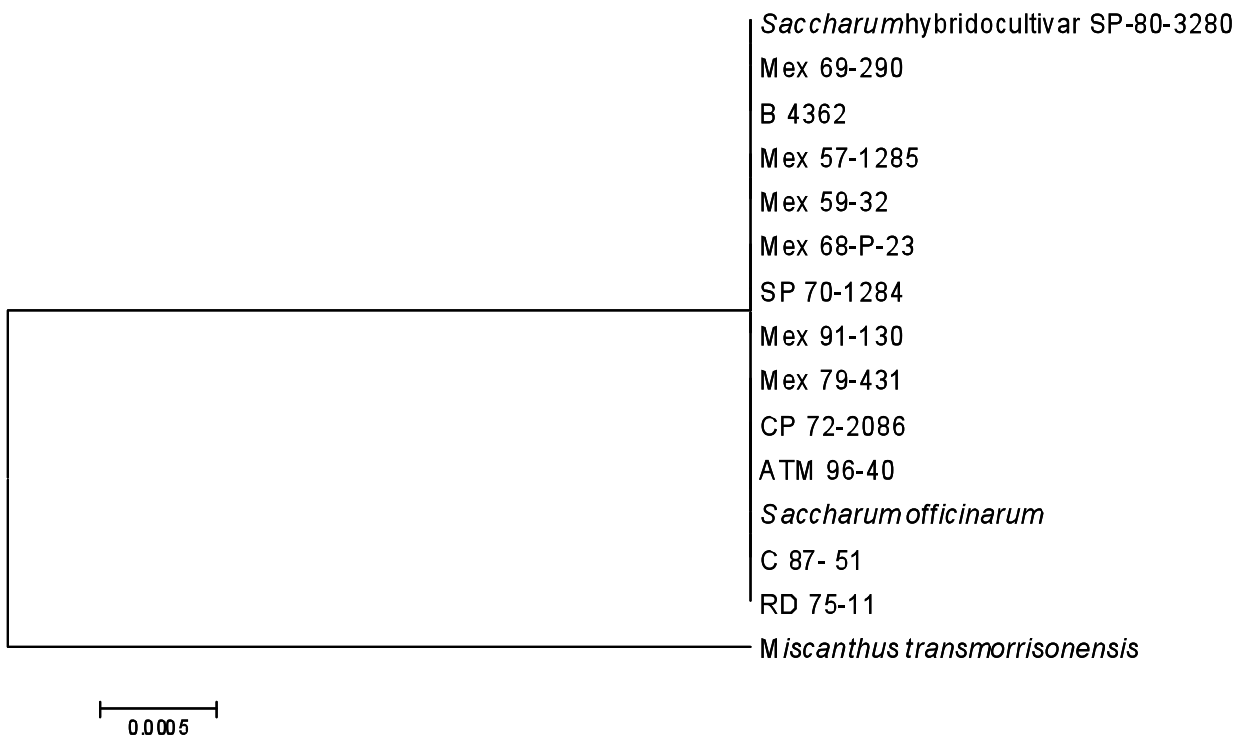


**Figura 12.** Amplificaciones de las 12 variedades de caña de azúcar mediante iniciadores *trnL-F*. Variedades: Dilución 1:5: 1) C 87-51; 2) Mex 57-1285; 3) Mex 59-32; 4) Mex 91-130; 5) ATM 96-40; 6) RD 75-11; 7) Mex 79-431; 8) B 4362; 9) Mex 69-290; 10) SP 70-1284; 11) CP 72-2086; 12) Mex 68-P-23; Marcador 1 kb. Dilución 1:30: 1) C 87-51; 2) Mex 57-1285; 3) Mex 59-32; 4) Mex 91-130; 5) ATM 96-40; 6) RD 75-11; 7) Mex 79-431; 8) B 4362; 9) Mex 69-290; 10) SP 70-1284; 11) CP 72-2086; 12) Mex 68-P-23; Marcador 1 kb.

Al elaborar el árbol filogenético construido en base a las secuencias de la región *trnL-F* se encontró que las 12 variedades estudiadas pertenecen a *Saccharum*

*officinarum* (Figura 13). Los genes de cloroplasto han sido amplificados con el genoma completo de la caña de azúcar (*S. officinarum*), es una molécula doble circular de DNA de 141,182 pb (Asano *et al.*, 2004) y Calsa *et al.*, 2004).

Estos modernos cultivares se heredan de las cruzas iniciadas al final del siglo XIX entre *Saccharum officinarum* y *Saccharum spontaneum* y tienen alrededor de 70-80% y 10-20% de cromosomas de dichas especies respectivamente (Piperidis y D'Hont 2001; Cuadrado *et al.*, 2004). Durante la transmisión de cromosomas en el proceso de “nobilizacion” se ha demostrado que *S. officinarum* transmite la totalidad de su complemento cromosómico somático (2n) cuando se cruza con *S. spontaneum* que a su vez transmite su haploide (n) (Roach, 1968), por lo que es más posible que las variedades comerciales modernas pertenezcan a *Saccharum officinarum* como se encontró para las variedades estudiadas del estado de Tabasco.



**Figura 13.** Árbol filogenético construido con las secuencias correspondientes al gen tRNAL de cloroplasto de 12 variedades de caña de azúcar, mediante el método Neighbor-joining y el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei con 1000 repeticiones bootstrap.

En la **Figura 14** se muestra la secuencias de aminoácidos de caña de azúcar del estado de Tabasco alineadas con las secuencias de *Sacharum officinarum*, depositadas en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). El resultado comprueba que las 12 variedades del estado de Tabasco pertenecen a *Sacharum officinarum*.

## 12 Variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco

GTGCATCATCTTAGTAAAGTATTTGCATCTATGTCAATTAAGGGACTAAAAATCAATAAAGTATTCCATTCAAAA  
 TTAGGAAATGGGAGGGGTAGTCCTATGCATTGTGGATGGCTTACTTAATAATACTTAAAAAATCGAATTAATAATC  
 GAGATTCCCTTGCCGATACTCTACTCTAATAAATAAAAAAAGAAATAAAAAAGAAATCATCTATTTAATGAATAGCA  
 TAAGATTCATTGAGTTCTTGTGCGCACTCCTTTGTGAAAGAGTAGAATGAGAAAGCTAGTGAATCTTAAACCCATTGA  
 TAAAAGAAAAAAGGATAACAACCTATGGTTAGGGAATAAAAAGAGGGTTTGGGGATAGAGGGACTTGAACCCTCACGA  
 CTTATAAAGTCGACGGATTTTCCTTTTACTAGAAATTTTCATTGTTGTGTCAGTATTGACATGTAGAATGGGACTCTCTC  
 TTTATCCTCGTCCGATTAATCCACTTTTTAAAAGATCTCGAAAACAATGAATTGAAGGATTTGATTACTCAATATTC  
 GATTGGAATAGATTACAATAATTCTAAAAAATTATGAATTTTCTATTTTCATAATCATTCCCTAATTTTCATTCTAAA  
 AATAAAATAAAGAACCTATATTATAATATGGGTTCTGTGATTAATCGTTATTACTTCGATTTCGTTAGAACAGCTTCC  
 ATTGAGTCTCTGCACCTATCCTTTTTCCTTTGGGTTCTAGTTTGAGAACCACTTGTTTTTTCAAAAAAGGGGATTTGG  
CTCAGGATTGCCCATTTTTTCAT

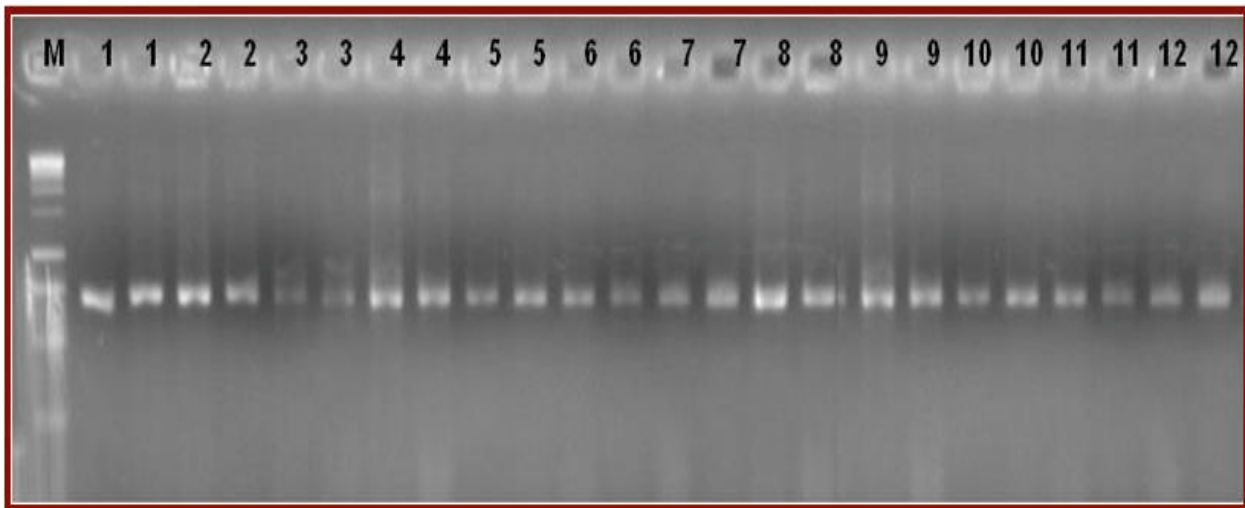
### *Saccharum officinarum*

GTGCATCATCTTAGTAAAGTATTTGCATCTATGTCAATTAAGGGACTAAAAATCAATAAAGTATTCCATTCAAAA  
 TTAGGAAATGGGAGGGGTAGTCCTATGCATTGTGGATGGCTTACTTAATAATACTTAAAAAATCGAATTAATAATC  
 GAGATTCCCTTGCCGATACTCTACTCTAATAAATAAAAAAAGAAATAAAAAAGAAATCATCTATTTAATGAATAGCA  
 TAAGATTCATTGAGTTCTTGTGCGCACTCCTTTGTGAAAGAGTAGAATGAGAAAGCTAGTGAATCTTAAACCCATTGA  
 TAAAAGAAAAAAGGATAACAACCTATGGTTAGGGAATAAAAAGAGGGTTTGGGGATAGAGGGACTTGAACCCTCACGA  
 CTTATAAAGTCGACGGATTTTCCTTTTACTAGAAATTTTCATTGTTGTGTCAGTATTGACATGTAGAATGGGACTCTCTC  
 TTTATCCTCGTCCGATTAATCCACTTTTTAAAAGATCTCGAAAACAATGAATTGAAGGATTTGATTACTCAATATTC  
 GATTGGAATAGATTACAATAATTCTAAAAAATTATGAATTTTCTATTTTCATAATCATTCCCTAATTTTCATTCTAAA  
 AATAAAATAAAGAACCTATATTATAATATGGGTTCTGTGATTAATCGTTATTACTTCGATTTCGTTAGAACAGCTTCC  
 ATTGAGTCTCTGCACCTATCCTTTTTCCTTTGGGTTCTAGTTTGAGAACCACTTGTTTTTTCAAAAAAGGGGATTTGG  
CTCAGGATTGCCCATTTTTTCAT

**Figura 14.** Secuencias de aminoácidos de caña de azúcar del estado de Tabasco y de *Sacharum officinarum*.

### 5.2.2. Amplificación de la región ITS del rDNA

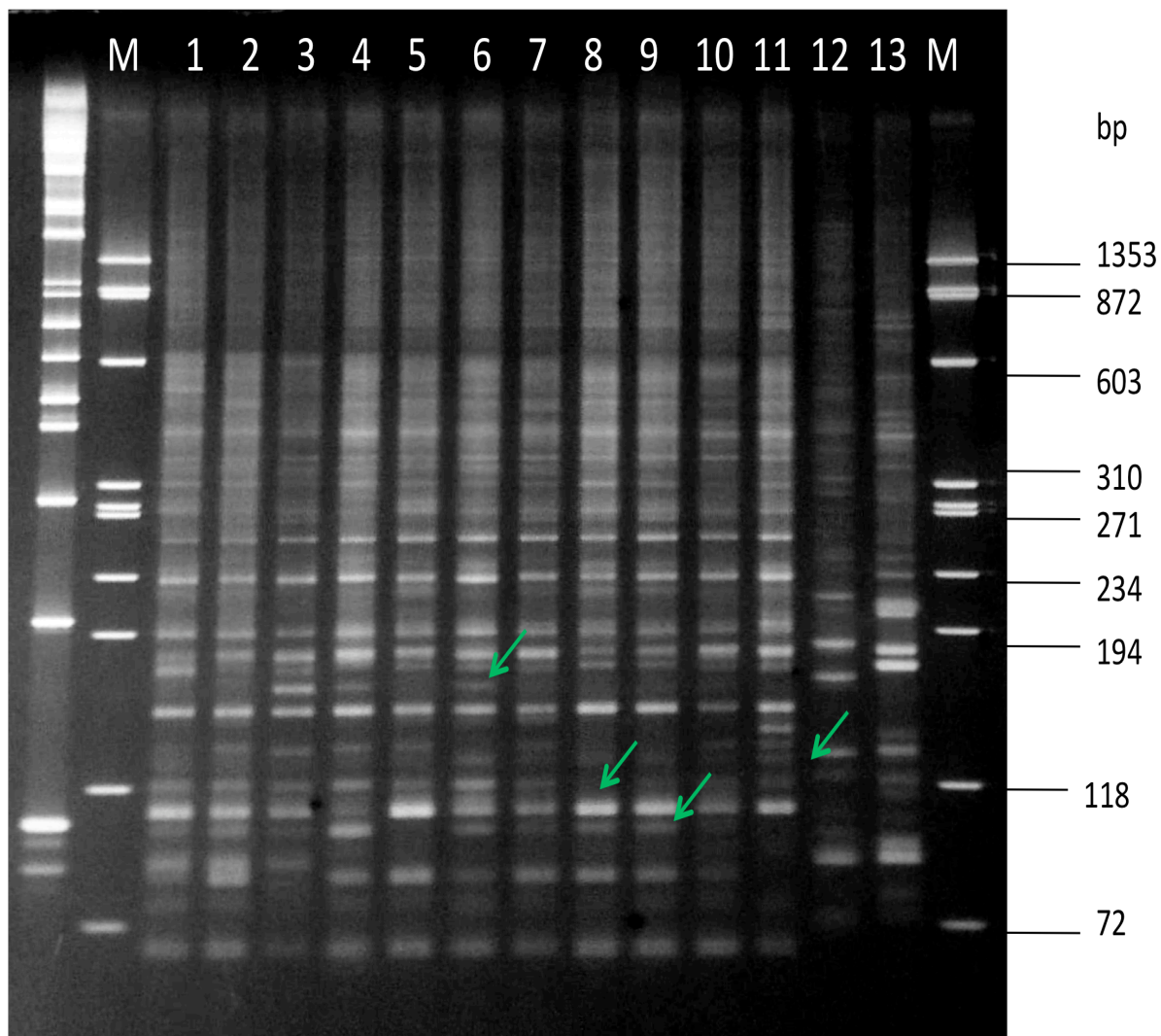
Al realizar la amplificación de la región ITS del rDNA, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 300 bp, basándose en el marcador de peso molecular de 1 kb (**Figura 15**). En la actualidad los ITS es uno de los fragmentos más amplificados para establecer relaciones filogenéticas entre plantas y hongos ya que tienen un área de alta variabilidad, lo que permite diferenciar individuos relacionados genéticamente (Atkins y Clark, 2004). Estos resultados fueron similares a los encontrados de la secuencia de la región *trnL-F* de cloroplasto de las 12 variedades de la caña de azúcar del estado de Tabasco, comprobándose que tanto la región de cloroplasto como la de ribosoma fueron efectivas para comprobar que las 12 variedades de caña de azúcar estudiadas pertenecen a *S. officinarum*.



**Figura 15.** Análisis de los ITS amplificados en 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco mediante iniciadores *trnL-trnF*. Variedades: 1) C 87-51, 2) Mex 57-1285, 3) Mex 59-32, 4) Mex 91-130, 5) ATM 96-40, 6) RD 75-11, 7) Mex 79-431, 8) B 4362, 9) Mex 69-290, 10) SP 70-1284, 11) CP 72-2086, 12) Mex 68-P-23, M) Marcador 1 kb.

### **5.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA TÉCNICA AFLP**

Los productos de amplificación evaluados, para visualizar y llevar a cabo análisis de polimorfismos con marcadores AFLP se observó que existe diferencia entre las variedades analizadas. Después de realizar 12 combinaciones de estos amplificadores se encontró que la combinación E-ACC/M-CTA fue la que mostró mayor polimorfismo entre variedades. El tamaño de los fragmentos polimórficos detectados con esta combinación de cebadores osciló desde 72 hasta 1353 pb (**Figura 16**).



**Figura 16.** Combinación E-ACC/M-CTA. Variedades: 1) 87-51, 2) Mex 57-1285, 3) Mex 59-32, 4) Mex 91-130, 5) ATM 96-40, 6) RD 75-11, 7) Mex 79-431, 8) B 4362, 9) Mex 69-290, 10) SP 70-1284, 11) CP 72-2086, 12) Mex 68-P-23, 13) control +, M) Marcador ( $\phi$  X 174/Hae – III). Las flechas indican la dispersión de las bandas polimórficas.

También se observó que existe un escaso polimorfismo detectado que indica la estrecha base genética de las 12 variedades evaluadas cultivadas en el estado de Tabasco. La estrecha base genética puede deberse a que el género *Saccharum* se caracteriza por una alta poliploidía y una aneuploidía frecuente (Cornide y Gálvez, 1999), además la caña de azúcar tiene un genoma complejo que va de 2500-4000 millones de pares de bases (Mbp/1C) (Arumuganathan y Earle, 1991). Solo *S. officinarum* tiene un genoma de DNA cloroplastico de 141,182 pb. (Asano *et al.*, 2004; Calsa *et al.*, 2004).



Otra razón del poco polimorfismo observado puede deberse que las cruzas entre genotipos se enfocan principalmente a la generación de variedades con resistencia a plagas y enfermedades (Harvey *et al.*, 1994). Estas cruzas han sido exitosas y han originado variedades de caña de azúcar más productivas pero con una marcada reducción en su base genética (Jannoo *et al.*, 1999).

La técnica AFLP ha mostrado resultados exitosos en caña de azúcar en varios países. Estudios realizados en Brasil, con 79 cultivares detectaron un promedio de 50% de polimorfismo (Lima *et al.*, 2002) En la India (Selvi *et al.*, 2006) reportaron un promedio de 52% de polimorfismo entre 28 cultivares, utilizando 12 combinaciones.

En México, Rodríguez *et al.* (2005) caracterizaron las 15 variedades más utilizadas en la producción de caña de azúcar, utilizando 12 combinaciones de AFLP. Sus resultados generaron un total de 884 marcadores, de los cuales 55.3% fueron polimórficos. Las variedades Mex 73523 y Mex 68-P23 se ubicaron en las ramas más alejadas del dendrograma y aparecen como no unidas a otras variedades.

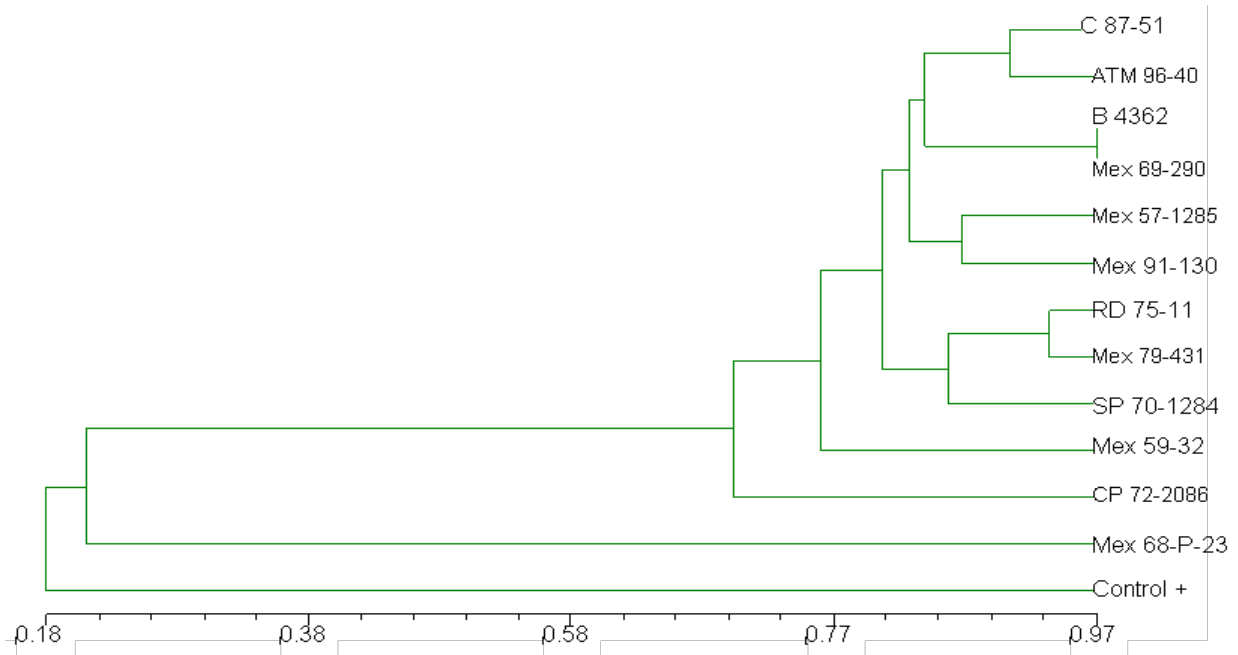
Raboin *et al.* (2008) hicieron un estudio poliploide en 72 clones de *Saccharum* spp utilizando la técnica AFLP. Encontraron 1,537 marcadores polimórficos con 42 combinaciones; de estos marcadores, solo 463 fueron localizados en el mapa genético.

El dendrograma reveló tres grupos distintos de *Saccharum* spp (**Figura 17**). El grupo I comprendió las C 87-51, ATM 96-40, B 4362, Mex 69-290, Mex 57-1285 y Mex 91-130, las cuales presentaron un 0.77% de similitud genética, estos materiales presentaron más cercanía genética, con el mayor coeficiente de similitud entre ellos comparados con las variedades del grupo II.

El grupo II comprendió las variedades, RD 75-1, Mex 79-431, SP 70-1284, Mex 59-32 y CP 72-2086, variedades que presentaron entre ellas un conglomerado, por consiguiente un 0.70% de características similares.

El grupo III lo integró la variedad Mex 68-P-23, de las variedades analizadas fue la que presentó una menor similitud genética con un 0.22% con el resto de las variedades. Resultados similares se encontraron por Rodríguez *et al.* (2005), en donde se comprobó que los genotipos estudiados constituyeron una población genéticamente estrecha, encontrando que la variedad Mex 68-P-23 fue una de las que mostró una mayor distancia genética lo cual pudiera indicar un incremento en la variabilidad genética y ser útil en futuras cruzas para el mejoramiento genético. Estos resultados

coinciden con los numerosos estudios de caña de azúcar que han demostrado la estrecha base genética de los cultivares modernos (Grivet *et al.*, 1996; Canales *et al.*, 2003).



**Figura 17.** Dendrograma basado en la similitud genética AFLP de 12 variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco.

Estudios realizados en genotipos de caña de azúcar han demostrado que existe un pequeño grado de diversidad a nivel del DNA entre las variedades modernas (Berding y Roach, 1987; Roach, 1989; Arro, 2005). En Cuba también se encontró que las variedades comerciales de caña de azúcar actuales presentan baja variabilidad genética entre ellas (Arencibia *et al.*, 2006), estos mismos resultados se han observado en otras especies de plantas, que tienen una estrecha base genética (Maughan *et al.*, 1999).

Deren (1995) y Jannoo *et al.* (1999) mencionan que los cruces de los cultivares modernos utilizados como progenitores de las primeras cruzas fueron retrocruzados varias veces con *S. officinarum* en un proceso conocido como “nobilización” dando como resultado que los nuevos híbridos mostraran una reducción en su base genética

## VI. CONCLUSIONES

### **Caracterización fenotípica**

➤ La forma del entrenudo, forma de la yema y conformación de la hoja permitieron caracterizar y diferenciar las 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco.

### **Amplificación de cloroplasto y ribosomas**

➤ La amplificación y secuenciación de la región *trnL-F* de cloroplasto y de la región ITS del DNA ribosómico, permitió la identificación que las 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco quienes pertenecen a *Saccharum officinarum*.

### **Caracterización molecular**

- Los resultados obtenidos confirman la utilidad de los AFLP para obtener el número necesario de marcadores para el análisis del genoma, así como la caracterización y detección de polimorfismos de 12 variedades de caña de azúcar del estado de Tabasco.
  
- De las doce combinaciones realizadas, la combinación E-ACC/M-CTA fue la que produjo mayores fragmentos polimórficos.
  
- La variedad Mex 68-P-23 presentó una distancia genética lejana con respecto al resto de las variedades analizadas.

### **VII. RECOMENDACIONES**

- ❖ Caracterizar molecularmente todas las variedades de caña de azúcar comerciales del estado de Tabasco.
  
- ❖ Extender la caracterización molecular de las variedades de caña de azúcar con otros marcadores de alto volumen como los microsatélites (SSR).

### **VIII. LITERATURA CITADA**

- Aitken, K. A. Jackson, P. A y McIntyre, C. L. 2005. A combination of AFLP and SSR markers provide extensive map coverage and identification of homo (eo) logouts linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theor Appl Genet* 110: 789 - 701.
- Arencibia, A. Delgado, M. Jorge, H. Coto, O. Ibis, J y Garcia, H. 2006. Caracterización molecular de variedades cubanas de caña de azúcar (*Saccharum spp*) mediante AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Volumen 29. Número 001. Sociedad Mexicana de Filogenética, A. C. Chapingo. México. pp. 19 - 25.
- Arro, J. A. 2005. Genetic diversity among sugarcane clones using Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) markers and pedigree relationships. Masters Thesis submitted to Louisiana State University, Baton Rouge.

- Artschwager, E y Brandes, E. W. 1958. Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Origin, classification, characteristics, and descriptions of representative clones. USDA Agric. Handbook 122. U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC. Agr. Handbook. P.122 - 307.
- Artschwager, E. 1954. A taxonomic study of *Saccharum sinense* Roxb. and *S. barberi* Jeswiet. USDA. Techn. Bull. P. 1089.
- Arumuganathan, K y Earle, E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep. 9: 208 – 218.
- Asano, T. Tsudzuki, T. Takahashi, S. Shimada, H. Kadowaki, K. 2004. Complete nucleotide sequence of the sugarcane (*Saccharum officinarum*) chloroplast genome: a comparative analysis of four monocot chloroplast genomes. Oxford Journals. DNA Research 11: 93 -99.
- Atkins, S y Clark, I. 2004. Fungal Molecular Diagnostics: A mini review. Journal of Applied genetics. 45: P 3 -15.
- Baindrige, B .W. Spreadbury, C. L. Scalise, F. G y Cohen, J. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. Microbiology Letter 66: 113 – 118.
- Baksha, R. Alam, R. Karim, M. Z. Paul, S. K. Hossain, M. A. Miah, M. A. S y Rahman. 2002. *In vitro* Shoot Tip Culture of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Variety Isd 28. Int. Quarterly J. Biotechnol. 1: 67 – 72.
- Barber, C. A. 1922. The classification of Indian canes. Intern. Sugar J. 24: 18 –2.
- Barrera, S. Ortiz, L. H. A. Rojas, M. R. Reséndez, P. A. D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo CONACYT. 18: 50 - 60.
- Barrett, B. A. Kidwell, K. K. Fox, P. N. 1998. Comparison of AFLP and pedigree based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. Crop. Sci. 38: 1271 -1278.
- Becker, J. Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F y Hun, M. 1995. Combined mapping of AFLP an RFLP marks in barley. Mol. Genet. 249: 65 -73.
- Berding, N y Roach, B. T. 1987. Germplasm, collection, maintenance and use. In D. J. Heinz (ed.) Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam. P. 143 -210.
- Besse, P. Taylor, G. Carroll, B. Berding, N. Burner, D. y McIntyre, C. L . 1998. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an

- automated AFLP analysis. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. *Genetica* 104: 143 –153.
- Bissessur, D. R. Tilney-Bassett, A. E. Chong, L. S. Dominguez, R y Julien, M. H. R. 2000. Family x environment and genotype x environment interactions for sugarcane across two contrasting marginal environments in Mauritius. *Expl. Agric.* 36: 101 -114.
- Booker, T. G. J. 2004. Sugarcane. World agriculture series. Second edition. 224 p.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, L y Davies, M. R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genet.* 32: 314 - 311.
- Bruns, T. D. White, T. J y Taylor, J. W. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525 - 564.
- Butcher, P. A. Glaubits, J. C y Moran, G. I. 2000. Aplicaciones de los marcadores microsatélites en la domesticación y conservación de árboles forestales. *Gen. Forest.* 27: 38 - 47.
- Caetano–Anolles, G y Triano, R. N. 1997. Nucleic acid markers in agricultural biotechnology. *Agbiotech New and Information.* 9: 233 -243.
- Cai, Q. Aitken, K. Deng, H. H. Chen, X. W. Fu, C. Jackson, P. A. McIntyre, C. L. 2005. Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane using molecular markers. *Journal Plant Breeding* ISSN 0179 – 9541. Vol. 24. No. 4. Pp. 322-328.
- Calsa, J. T. Carraro, D. M. Benatti, M. R. Barbosa, A. C. Kitajima, J. P. Carrer, H. 2004. Structural features and transcript-editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) chloroplast genome. *Curr Genet.* 46: 366 – 373.
- Canales, E. Coto, O y Cornide, M. T. 2003. Variación genética e identificación de cultivares cubanos de caña de azúcar mediante RFLP. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* Vol. 34. No. 3. P129 -136.
- CIMMYT. (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México. D. F. p. 92.
- Ciofi, C. S., Funk, T., Coote, D. Cheesman, R. Hammond, I., Saccheri y Bruford, M. 1998. Genotyping with microsatellite markes. En molecular tools for screening biodiversity. A kart, pg Isaac y DS Ingram (Eds) Chapman and May. 11: 195 - 2001.

- Cordeiro, G. M. Pan, Y. B y Henry, R. J. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* 165: 181-189.
- Cornide, M. T y Gálvez, G. 1999. Los marcadores moleculares y el programa de mejoramiento de la caña de azúcar. En: *Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar*. Ed. Elfos Scintiae, p 45 - 62.
- Cuadrado, A. Acevedo, R. De Moreno, D. E. S. Jouve, N. De la Torre, C. 2004. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. *J Exp Bot* 55:847– 854.
- Curtis, H y Barnes, N. S. 2000. *Biología*. 6º Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1498 pp.
- D'Hont, A. Grivet, L. Feldmann, P. Rao, S. Berding, N. Glaszmann, J. C. 1996. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular cytogenetics. *Mol. Genet.* 250: 405 – 413.
- D'Hont, A. Ison, D. Alix, K. Roux, C. y Glaszmann, J. C. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes *Genome* 41: 221 – 225.
- Daniels J y Roach B. T. 1987. Taxonomy and evolution. In: Heinz D.J. (ed.), *Sugarcane Improvement through Breeding*. Elsevier, Amsterdam. P. 7-84.
- Daniels, J. Daniels, C. A. 1975. Geographical, historical and cultural aspects of the origin of the Indian and Chinese sugarcane *S. barberi* and *S. sinense*. *Sugarcane Breed Newslett.* 36: 4 - 23.
- Davila, J. A y Loarce, E. F. 1999. Characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley. *Theor Appl Genet* 98: 265 - 273.
- Deren, C.W. 1995. Genetic Base of U.S. Mainland Sugarcane. *Crop Science* 35:1195 - 1199.
- Edmé, S. J. Glynn, N. G y Comstock, J. C. 2006. Genetic segregation of microsatellite markers in *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum*. *Heredity.* 366–375.
- Enoki, H. Sato, H y Koinuma, K. 2002. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1270 -1277.
- Ferreira, M. E. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia, Embrapa-Cenargen. Documento 20. p 220.

- Forrest, G. 1994. Biochemical markers in tree improvement programmes. *Forestry-Abstracts* 55: 123 -153.
- Gielly, L y Taberlet, P. 1996. A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast trnL (UAA) intron sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 120: 57-75.
- Glaszmann, J. C y D' Hont A. 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 Scientai. La Habana Cuba. Pp. 25-45.
- Grassl C. O. 1977. The origin of sugar producing cultivars of *Saccharum*. *Sugarcane Breeding Newsl.* 39: 8-33.
- Grassl, C. O. 1974. The origin of sugarcane. *Sugarcane Breeding Newsl.* 34: 10-18.
- Grivet, L y Arruda, P. 2002. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5: 122 -12.
- Grivet, L. Arruda, P. 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr Opin Plant Biol* 5: 122 -127.
- Grivet, L. D'Hont, A. Rodrigues, D. Feldmann, P. Lanaud, C y Glaszmann, J. C. 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum spp.*): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* (3): 987
- Grodzicker, T. Williams, J. Sharp, P y Sambrook, J. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39:439-446.
- Guimaraes, C. T y Sobral, B. W. S. 1998. The *Saccharum* complex: relation to other *Andropogoneae*. *Plant Breed Rev* 16: 269 -288.
- Gur-Arie, R., Cohen, C. J., Eitan, Y., Shelef, L., Hallerman, E. M y Kashi, Y. 2000. Simple sequence repeats In *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Res.* 10: 62 -71.
- Ha, S. Moore, P. H. Heinz, D. Kato, S. Ohmido, N. y Fukui, K. 1999, Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization and imaging methods, *Plant. Mol. Biol.*, 39: 1165 -1173.
- Harvey, M. Hockett, B. Botha, F. 1994. Use of polymerase chain reaction (PCR) and random aplitic auto to polymorphic DNAs (RAPDs) for the determination of genetic distances between sugarcane varieties en proceedings of the South African Technologist Association SASTA. P. 36 - 40.



- Helentjaris, T. King, G. Slocum, M. Siedenstrang, C y Wegman, S. 1985. Restriction Fragment Length Polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Molecular Biology*. 5: 109 - 118.
- Hill, M. Witsenboer, H. Zabeau, M. Vos, P. Kesseli, R y Michelmore, R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor Appl Genet*. 93: 1202 –1210.
- Hoarau, J. Y. Grivet, L. Offmann, B. D'Hont, A. Risterucci, A. M. Roques, D. Glaszmann, J. C. Grivet, L. 2001. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. *Theor Appl Genet* 103: 84 –97.
- Hodkinson, T. R. Chase, M. W. Lledó, M. D. Stephen, N. S. Renvoize, A. 2002. Phylogenetics of *Miscanthus*, *saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *J Plant Res*. 115: 381–392.
- Humber, R. P. 1974. El cultivo de la caña de azúcar en México. Compañía Editorial Continental. 719 p.
- Irvine, J. E. 1999. *Saccharum* species as horticultural classes. *Theor Appl Genet*. 98: 186 –194.
- Jackson, W. 2005. Crop report. Rust – L97-128. Contact Comittee Report .The Sugar Bulletin (August): 7 – 8.
- Jannoo, N. L. Grivet, M. Seguin, F. Paulet, R. Domaingue, P. S. Rao, A. Dookun, A. D'Hont y Glaszmann, J. C. 1999. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theor Appl Genet*. 99: 171-184.
- Karp, A y Edwards, K.1998. DNA markets a global overview. In: G Caetano –Anolles P M eds. DNA markets: protocols, application and overview. Gresshof. New Yort.p 1 - 13.
- King, R. C. Stansfield, W. D.1990. A dictionary of genetics. 4th ed., Oxford University Press, New York-Oxford, p. 188.
- Laborde, C. Legendre, B. K. Bischoff; Gravois, K y Todd, R. 2008. Sugarcane Variety Identification Guide. The Louisiana Cooperative Extension Service provides equal opportunities in programs and employment. Pp. 1-23. in: [www.lsuagcenter.com](http://www.lsuagcenter.com). Consultado el: 21/sep/2008.

- Lima, M. L. A. García, A. A. F. Oliveira, K. M. Matsuoka. S. H. Arizono.; C. L. De Souza Jr.; A. P. De Souza. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum spp.*) Theor Appl Genet. 104: 30 – 38.
- Lowe, A. Harris, S y Ashton, P. 2004. Ecological genetics design, analysis and application. Blackwell Science. 326p.
- Lu, Y. H. D'Hont, A. Walker, D. J. T. Rao, P. S. Feldmann, P y Glaszmann, J. C. 1994. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single-copy maize nuclear probes. Euphytica 78:7–18.
- Magari, R y M, Kang. 1993. Genotype selection via a new yield stability statistic in maize yield trials. Euphytica 70:105-111.
- Maughan, P. J. Saghai –Maroof, M. A. Buss, G. R. Huestis, G. M. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor Appl Genet. 93: 392–401.
- Mauselli, R. W. 1999. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. Avance en horticultura 4 Edición on-line. Universidad Nacional de Cuyo, C.C 7(5505). Argentina. P 54-66. Consultado el: 25/oct/2008.
- Mora, P. W. Rodríguez, H y Fritz, P. J. 1995. Marcadores de DNA: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Unidad de biotecnología. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE) Costa Rica. Serie técnica. Informe técnico No. 252. 183 p.
- Morgante, M. Hanafer, M y Powell, W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nat Genet 30: 194 - 200.
- Mullis, K. B. 1975. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am. 262: 56-54, 64- 65.
- Nawshad, J. Yoesh, P y Asha, D. S. 2005. Application of microsatellite markers to the sugarcane breeding programme. Biotechnology Department. Meeting of Agricultural Scientists.
- NCBI (National Center for Biotechnology information). 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4546>. Consultado el: 20/sep/2008.
- Parthasarathy, N. 1946. The probable origin of north Indian sugarcane. J. Indian Bot. Soc. P. 133–150.

- Pérez, G. Bernal, N. China, A. Rely, J. O. De Prada, F. 1997. Recursos genéticos de la caña de azúcar. Publicaciones Imago. Habana, 249 p.
- Phillips, W. 1998. Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. In Memoria II Congreso nacional de estudiantes del sector agropecuario costarricense. IICA-EARTH-CATIE. P. 77-87.
- Phillips, W. Rodríguez, H y Fritz, P. 1995. Cacao y marcadores de DNA en el CATIE. In Simposio CIRAD/CATIE mejoramiento genético y desarrollo de los cultivos tropicales (CATIE, Turrialba, CR. 20 al 29 nov. 1995) p. 24- 25.
- Piperidis, G. D'Hont, A. 2001. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic *in situ* hybridization (GISH). Int Soc Sugarcane Technol Congress 11: 565
- Price, S. 1968. Cytology of Chinese and North Indian sugarcane. Econ Bot. 22: 155-164.
- Raboin, L. M. Pauquet, J. Butterfield, M. D'Hont, A. Glaszmann, J. C. 2008. Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane. Theor Appl Genet 116:701–714.
- Rallo, P. Belajat, A. De la Rosa, R., y Trujillo I. 2002. Marcadores moleculares. Córdoba, España.
- Ramdoyal, K y Badaloo, G. H. 2002. 29 Prebreeding in Sugarcane with an Emphasis on the Programme of the Mauritius Sugar Industry Research Institute. Mauritius Sugar Industry Research Institute, Reduit, Republic of Mauritius managing Plant Genetic Diversity. P.307-321.
- Rea, R y Vieira, O. D. E. S. 2002. Genotype X Environment interactions in sugarcane yield trials in the central-wester region of Venezuela. Interciencia. 27: 620 - 624.
- Reffay, N. Jackson, P. A. Aitken, K. S. Hoarau, J. Y. D'Hont, A. Besse, P. y McIntyre, C. L. 2005. Characterization of genome regions incorporated from an important wild relative into Australian sugarcane. Mol. Breed 15: 367 - 381.
- Roach, B. T. 1968. Quantitative effects of hybridisation in *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum* crosses. Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists 13: 939 – 954.
- Roach, B. T. 1989. Origin and improvement of genetic base of sugarcane. Proceedings of the Australian Society of Sugarcane. Technologies 11: 34- 47.
- Rodríguez, H. A. M. Castillo, C. M. A. Flores, B. E. P. 2005. Genetic Diversity of the most important sugar cane cultivars in México. e-Gnosis. Vol. 3. Universidad de

Guadalajara. ISSN (Versión en línea): 1665 – 5745. México. Consultado el: 15/sep/2008.

- Rodríguez, O y González, V. 1984. Caracterización de variedades de caña de azúcar. *Caña de Azúcar* 2:89 -108.
- Rossi, M. Araujo, P. G. Paulet, F. Garsmeur, O. Dias, V. M. Chen, H. Van- Sluys, M. A. D'Hont, A. D. 2003. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. 269: 406 – 419.
- Ruiz, S. F. 1995. El cultivo de la caña de azúcar. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica. 448 p.
- Salazar, E. Surga, J. G. 1986. Aplicación de la técnica de cultivo de tejido meristemático *in vitro* a cuatro cultivares de caña de azúcar (*Saccharum sp.*). *Caña de Azúcar* 4: 55-80.
- Savelkoul, P J. M. Aarts, H J M. J de Haas; L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J. L. W. Schouis, L y Lenstra, J. A. 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3083 - 3091.
- Schugurensky, A y Diaz, L. 2001. Identificación de clones micropropagados de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) por electroforesis de isoenzimas. *Rev Fac. Agron. (LUZ)* 18: 176-186.
- Selvi, A. Nair, N. V. Noyer, J. L. Singh, N. K. Balasundaram, N. Bansal, K. C. Koundal y Mohapatra, T. 2006. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity in the sugarcane complex, *Saccharum* and *Erianthus*. *Genetic Resources and Crop Evolution*.53: 831–842.
- Semagn, K. Bjornstad, A y Ndjioudjop, M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5. pp. 2540-2568.
- Sensi, E. Vignani, R. Rohde, W y Biricolti, S. 1996. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. sangiovese and colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35: 183–188.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca). 2007. In: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>. Consultado el: 5/oct/2008.
- Skinner, J. C. 1971. Description of Sugarcane Clones. 3. Botanical. Descripton. *Procc. ISSCT*. 14: 124 - 127.
- Small, R. L. Ryburn, J. A. Cronn, R. C. Seelanan, T y Wendel, J. F. 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequence

- for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group. *Am. J. Bot.* 85: 1301-1315.
- Sreenivasan, T. V. Ahloowalia, B. S y Heinz, D. J. 1987. Cytogenetics in: Heinz D. J. (ed), Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam. pp. 211-253.
- Stevenson, G. C. 1965. Genetic and breeding of sugarcane. Longmans, Green and Co. Ltd. London: 284 p.
- Taberlet, P. Gielly, L. Pautou, G y Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105 - 1109.
- Tai, P. Y. P. Miller, J. D y Legendre, B. L. 1995. Evaluation of World Collection of *Saccharum spontaneum* L. Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists 21. 250 – 260.
- Tamura K, Dudley J, Nei M y Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Taupier, L. O. G. 1983. La caña de azúcar en Cuba. Editorial Científico Técnica. Pp.611.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2008. [http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/\\_s.7\\_0\\_A/7\\_0\\_1OB?navtype=SU&navid=AGRICULTURE](http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/_s.7_0_A/7_0_1OB?navtype=SU&navid=AGRICULTURE) consultado el: 22/oct/2008.
- Valadez, M. E y Kahl, G. 2000. Huellas del DNA en genomas de plantas (teorías y protocolos de laboratorio). Universidad Autónoma Chapingo. Ed. Mundi – Prensa. México. 147 p.
- Valdez, B. A. 1998. Evaluación agroindustrial de 12 clones de caña de azúcar en la Chontalpa Tabasco. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 121p.
- Vasil, I. K. 1980. Perspectives in plant cell and tissue culture. International Review of Citology Academic Press.
- Vuylsteke, M. Mank, R. Brugmans, B. Stam, P and Kuiper, M. 2000. Further characterization of AFLP data as a tool in genetic diversity assessments among maize inbred lines. *Mol. Breed.* 6:265 –276.

- Vendramin, G. G. Lelli, L. Rossi, P and Morgante, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595-598.
- Vijayan, N. Suresh, N. Nair-Sreenivasan, T. V y Mohan, M. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genet Resources and Crop Evolution* 46: 73 – 79.
- Vos, P. Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, M. Van, Der Lee T y Hornes, M .1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407– 4414.
- Waugh, R y Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnonology*.186 -192.
- Welsh, J y McClelland, M. 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*18:7213-7218.
- White, T. J. Bruns, T. Lee, S y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols* (Innis, M.A., Gelfrand, D.H., Sninsky, J.J. and White, J., eds.) p. 315 - 322.
- Williams, C. A. Harborne, J. B y Smith, P. 1974. The taxonomic significance of leaf flavonoids in *Saccharum* and related genera. *Phytochemistry* 13: 1141 –1149.
- Williams, J. G. K. Kubelik, A. R. Livak, K. J. Rafalski, J. A y Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 - 6535.
- Yang, R y Baker, R. 1991. Genotype – environment interactions in two wheat crosses. *Crop Sci.* 31:83 - 87.