

Diversidad genética en germoplasma de caña de azúcar usando marcadores trap a nivel de genes de sacarosa

Genetic diversity in sugarcane germplasm using trap markers based on sucrose-related genes

D. Sosa¹, R. Rea¹, C. Latorre¹, S. Molina¹, J. Demey¹,
R. Briceño² y O. De Sousa-Vieira²

¹Fundación Instituto de Estudios Avanzados, Carretera Nacional Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas, Baruta, Edo. Miranda, Caracas 1015-A, Venezuela, Apartado 17606. ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. INIA-Yaracuy, Venezuela. Carretera Vía Aeropuerto, sector La Ermita, municipio Cocorote, estado Yaracuy, Venezuela.

Resumen

El conocimiento de la diversidad genética existente en el germoplasma de caña de azúcar es clave para los procesos de mejoramiento genético, permite hacer cruces efectivos con el propósito de inducir variabilidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad genética de 62 progenitores del programa de mejoramiento genético de la caña de azúcar del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), mediante marcadores moleculares TRAPS. Durante el 2011, en el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Venezuela, se evaluaron 7 iniciadores para marcadores TRAPS. Con los 7 iniciadores fijados y 2 arbitrarios se obtuvieron 1303 bandas todas polimórficas cuyo tamaño osciló entre 84 y 760 pb con una media de 93 bandas por combinación de iniciadores. El análisis de coordenadas principales utilizando el coeficiente de Dice permitió la formación tres grupos de genotipos en los cuales los individuos son proyectados sin un patrón asociado a su procedencia. Estos grupos presentaron una similitud genética media de $0,51 \pm 0,0069$, $0,49 \pm 0,0057$ y $0,48 \pm 0,0057$, respectivamente. La diversidad genética entre grupos fue significativamente ($P < 0,05$) diferente entre ellos. Esta variabilidad genética existente entre los progenitores, aunque pareciera insignificante, puede ser optimizada en futuras cruzas con el fin de incrementar la variabilidad en el contenido de azúcar en la obtención nuevos cultivares.

Palabras clave: *Saccharum* spp., híbrido, progenitores, similitud genética.

Abstract

The knowledge of the existing genetic diversity in the sugarcane germplasm is the key to the processes of genetic improvement, because it allows making crosses more effectively with the aim to get new cultivars. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of 62 progenitors of the sugarcane breeding program from the National Institute of agricultural research (INIA) using molecular markers TRAPS. During 2011, in the laboratory of Molecular Biology of the Foundation Institute of advanced studies (IDEA), Venezuela, seven initiators were evaluated for marker TRAPS. With the seven fixed initiators and two arbitrary ones were obtained 1303 all polymorphic bands whose size ranged between 84 and 760 pb with an average of 93 bands per combination of initiators. Three genotype groups were formed in which individuals are projected without a pattern associated with its origin. These groups presented a genetic similarity average 0.51 ± 0.0069 , 0.49 ± 0.0057 and 0.48 ± 0.0057 , respectively. Genetic diversity among groups was significantly ($P < 0.05$) different among them. Although this genetic variability in parents seems to be small, it can be optimized in future cross with the purpose of obtaining greater variability or sugar content in new sugarcane cultivars.

Key words: Molecular marker, *Saccharum* spp hybrid, progenitors, genetic similarity

Introducción

La caña de azúcar es cultivada en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo. Más de 100 países producen cerca de 159 millones de toneladas de azúcar por año del cual el 80 % es de la caña de azúcar. En muchos países el objetivo principal del cultivo de caña es la producción de azúcar, en la actualidad hay un interés creciente en la explotación como cultivo bioenergético (Suman *et al.*, 2012).

En Venezuela, la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) es un cultivo tradicional, distribuido en casi todas las zonas agrícolas del país y del área cultivada se obtiene la biomasa suficiente para producir 550 mil toneladas de azúcar lo cual representa el 40% del consumo nacional, haciendo

Introduction

Sugar cane is cropped in tropical and sub-tropical regions of the world. More than 100 countries produce approximately 159 tons of sugar per year, out of which 80% is sugar cane. In many countries, the main objective of the cane crop is the production of sugar, currently there is a growing interest on its exploitation as bioenergetic crop (Suman *et al.*, 2012).

In Venezuela, sugar cane (*Saccharum* spp. hybrid) is a traditional crop distributed in almost all the agricultural areas of the country, and from the cropped area is obtained the biomass to produce 550 thousand tons of sugar, which represents the 40% of the national consumption; thus, importing the deficit (FEDEAGRO, 2012).

que el déficit deba importarse (FEDEAGRO, 2012).

En el país, al igual que en la mayoría de los países productores de caña de azúcar del mundo, existe un programa de introducción, obtención y selección de variedades de caña de azúcar (Rea *et al.*, 1994); encaminado al desarrollo de variedades nuevas que permitan la sustitución efectiva de los materiales en proceso de deterioro y que cumplan con todas o la mayoría de las características requeridas de un clon ideal de caña de azúcar: alto rendimiento de caña-azúcar, cañas erectas, desnudas, soqueras, adaptadas a condiciones adversas de clima y suelos y resistentes a enfermedades e insectos plagas (De Sousa-Vieira *et al.*, 2008).

En tal sentido, el país cuenta con el Programa para el Desarrollo de Variedades de Caña de Azúcar (PVDVCA), el programa contiene una colección activa de progenitores seleccionados por su habilidad para producir progenie de calidad. La selección de los progenitores que van a ser utilizados en el programa de mejoramiento genético, es una de las decisiones más importantes del mejorador (De Sousa-Vieira *et al.*, 2008) antes de llevar a cabo la cruce. Tradicionalmente, estos progenitores son caracterizados e identificados mediante marcadores morfológicos y agronómicos; sin embargo, los marcadores moleculares tienen un gran potencial para mejorar la precisión en la selección de genotipos (Soltis y Soltis, 1993; Da Silva y Bressiani, 2005) que van a ser utilizados en los cruzamientos de las campañas anuales de hibridación. Los marcadores TRAP (Target Región Amplification Polymorphism) (Hu y Vick, 2003), a pesar de que se

In the country, as well as in most of the producing countries of sugar cane in the world, there is an introduction, obtaining and selecting program of sugar cane varieties (Rea *et al.*, 1994), committed to the development of new varieties that allow the effective substitution of the materials under deterioration and that fulfill all or most of the characteristics required of an ideal clone of sugar cane: high yield of sugar-cane, straight canes, bared canes, adapted to adverse weather and soil conditions and resistant to diseases, insects and pests (De Sousa-Vieira *et al.*, 2008).

On this matter, the country has a program for the development of sugar cane's varieties (PVDVCA), which contains an active collection of progenitors selected by their ability to produce quality progeny. The selection of the progenitors about to be used in the breeding program is one of the most important decisions of the breeder (De Souza-Vieira *et al.*, 2008) before crossing. Traditionally, these progenitors characterize and identify with morphological and agronomic markers; however, molecular markers have a great potential to improve the accuracy in the selection of the genotypes (Soltis and Soltis, 1993; Da Silva and Bressiani, 2005) that will be used in the crosses of annual hybridization campaigns. Trap markers (Target Region Amplification Polymorphism) (Hu and Vick, 2003), even though can be considered as young markers, have been successfully employed in cane by several authors (Alwala *et al.*, 2006a; Alwala *et al.*, 2006b; Andru *et al.*, 2011; Da Silva and Bressiani, 2005; Khan *et al.*,

les puede considerar como marcadores jóvenes, han sido exitosamente empleados en caña por numerosos autores (Alwala *et al.*, 2006a; Alwala *et al.*, 2006b; Andru *et al.*, 2011; Da Silva y Bressiani, 2005; Khan *et al.*, 2011; Suman *et al.*, 2012). La aplicabilidad de esta técnica consiste en el genotípico del germoplasma, y la búsqueda de diversidad genética en marcadores asociados con características agronómicas deseables para selección asistida por marcadores.

Considerando que los estudios sobre la diversidad genética e interrelaciones entre los genotipos permiten obtener información útil que facilita el desarrollo de materiales mejorados, el objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética existente en una muestra de progenitores del banco de germoplasma de caña de azúcar de Venezuela mediante el uso de marcadores TRAP.

Materiales y métodos

Material vegetal y extracción de ADN. Se seleccionaron 62 progenitores del banco de germoplasma del programa de mejoramiento genético de caña de azúcar del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) (cuadro 1). Para la extracción de ADN a partir de hojas jóvenes se utilizó el Plant DNeasy Mini Kit™ Qiagen®. La calidad y cantidad del ADN extraído se determinó en geles de agarosa (1%, P/V) a 80 voltios durante 50 minutos, comparándose con un marcador de peso molecular Lambda (λ) ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

Amplificación con marcadores TRAP. Se utilizaron combinaciones de dos iniciadores, un primer ini-

2011; Suman *et al.*, 2012). The application of this technique consists on the germplasm genotype and the look of the genetic diversity in markers associated to the desirable agronomic characteristics for the selection assisted by markers.

Considering that the studies done about the genetic diversity and interrelations among the genotypes allow obtaining useful information that makes easy the development of improved materials; thus, the aim of this research was to evaluate the genetic diversity in a progenitor sample of the germplasm bank of sugar cane in Venezuela using TRAP markers.

Materials and methods

Vegetal material and DNA extraction. 62 progenitors extracted from the germplasm bank of the breeding program of sugar cane of the National Institute of Agricultural Research (INIA) (table 1). For extracting the DNA after young leaves the Plant DNeasy Mini Kit™ Qiagen® was used. The quality and quantity of DNA extracted was determined in agarose gels (1%, P/V) at 80 volts for 50 minutes, comparing with a weight molecular markers Lambda (λ) ($100 \text{ ng} / \mu\text{L}$).

Amplification with TRAP markers. Combinations of two initiators were used, one first initiator which sequence is designed after the sequences known of coded genes or expressed sequence tag (EST) with the aim of finding polymorphisms in functional genes and a second initiator of arbitrary sequence generally rich in

Cuadro 1. Procedencia de 62 progenitores de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido) del programa de mejoramiento genético del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).

Table 1. Origin of 62 sugar cane progenitors (*Saccharum* spp. Hybrid) of the breeding program of the National Institute of Agricultural Research (INIA).

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

ciador cuya secuencia está diseñada a partir de secuencias conocidas de genes codificantes o Expressed Sequence Tag (EST) con la finalidad de encontrar polimorfismos en genes funcionales y un segundo iniciador de secuencia arbitraria generalmente rico en repeticiones AT o GC que hibridan con regiones de intrones y exones respectivamente (Alwala *et al.*, 2006b). Las combinaciones fueron SuSy/Arb 2 y 3, SAI/Arb 2 y 3, PODK/Arb 2 y 3, Sut4/Arb 2 y 3, SuPS/Arb 2 y 3, StSy/Arb 2 y 3 (Alwala *et al.*, 2003) y SPS/ Arb 2 y 3 Calsa-Junior (2005) en Creste *et al.* 2010.

La reacción de PCR para la amplificación de los polimorfismos con los marcadores TRAP, se realizó según el protocolo de Alwala *et al.* (2006a) en un volumen final de 20µL. La reacción estuvo sujeta a un ciclo inicial de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguido de 5 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 35°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto. A continuación 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 53°C por 45 segundos, y 72°C por 1 minuto. Finalmente una extensión a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de la amplificación fueron concentrados, teñidos con formamida y desnaturalizados. El marcador de peso que se utilizó como patrón fue el Fluorescent Ladder (60-4000 pb). Su visualización se hizo por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida 6% aplicando 75 W, durante aproximadamente 1 hora. El gel fue leído en un escáner Typhoon con el láser 670 BP 30. Esta investigación fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela.

AT or GC replications with introns and exons regions, respectively (Alwala *et al.*, 2006b). The combinations were SuSy/Arb 2 and 3, SAI/Arb 2 and 3, PODK/Arb 2 and 3, Sut4/Arb 2 and 3, SuPS/Arb 2 and 3, StSy/Arb 2 and 3 (Alwala *et al.*, 2003) and SPS/ Arb 2 and 3 Calsa-Junior (2005) in Creste *et al.* 2010.

The PCR reaction by the amplification of the polymorphisms with TRAP markers was done according to the Alwala *et al.* (2006a) protocol in a final volume of 20µL. The reaction was submitted to a initial desnaturalization phase at 94°C for 4 minutes, followed by 5 cycles of 94°C for 45 seconds, 35°C for 45 seconds and 72°C for 1 minutes. Later, 35 cycles of 94°C for 45 seconds, 53°C for 45 seconds, and 72°C for 1 minute. Finally an extension at 72°C for 7 minutes. The amplification products were concentrated, tinted with formamide and denatured. The weight markers used as a pattern was Fluorescent Ladder (60-4000 pb). Its visualization was done by electrophoresis in gel of polyacrylamide 6% applying 75 W for approximately 1 hour. The gel was read on a Typhoon scanner with laser 670 BP 30. This research was done in the Molecular Biology Laboratory of the Institute of Advanced Researches, Caracas, Venezuela.

Analysis techniques and data processing. The amplification fragments obtained (bands) were codified according to a dominant marker, that is, A1A1=A1A2=1 (present band) and A2A2=0 (absent band), generating a column by locus for each initiator in a data matrix. The polymorphisms level and the

Técnicas de análisis y procesamiento de datos. Los fragmentos de amplificación obtenidos (bandas) fueron codificados de acuerdo a un marcador dominante, es decir, $A1A1=A1A2=1$ (banda presente) y $A2A2=0$ (banda ausente), generando una columna por locus para cada iniciador en una matriz de datos. El nivel de polimorfismo y la capacidad discriminatoria de cada iniciador se valoró a través del contenido de información polimórfica (PIC) y la probabilidad de obtener parejas idénticas de alelos entre las muestras estudiadas (Demey *et al.*, 2003). La relación genética entre los 62 progenitores se estudió aplicando la metodología propuesta por Demey *et al.* (2008) plantean el uso combinado del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), sobre datos de disimilitud utilizando los coeficientes de Jaccard, Emparejamiento simple, Dice y Rogers y Tanimoto (Sneath y Sokal, 1973). El número k de dimensiones a ser retenidas, el coeficiente de similitud que mejor defina la estructura de los datos y las medidas de la calidad, fueron calculados también utilizando los procedimientos descritos por Demey *et al.* (2008). Para el cálculo de la capacidad informativa y discriminatoria de los iniciadores se utilizó el software InfoGen (Balzarini *et al.*, 2010).

Resultados y discusión

Análisis de la variabilidad para TRAP. Los marcadores TRAP, derivados de genes candidatos, son marcadores que pueden estar directamente involucrados en variaciones de un rasgo fenotípico. Por lo tanto, en

discriminatory capacity of each initiator were valued with the polymorphic information content (PIC) and the probability of obtaining identical allele couples among the studied samples (Demey *et al.*, 2003). The genetic relation among the 62 progenitors was studied applying the methodology proposed by Demey *et al.* (2008), who propose the combined use of the analysis of main coordinates (ACoP), about dissimilitude data using the Jaccard coefficients, simple pairing, Dice and Rogers and Tanimoto (Sneath and Sokal, 1973). The k number of dimensions to be retained, the similitude coefficient that better defines the data structure and the quality measures were also calculated using the procedures described by Demey *et al.* (2008). The InfoGen software was used for calculating the informative and discriminatory capacity of the initiators (Balzarini *et al.*, 2010).

Results and discussion

Variability analysis for TRAP. TRAP markers, derived from the candidate genes, are markers that might be directly involved in variations of a phenotype trait. Therefore, in the current research their potential was evaluated to estimate the genetic similitude (GS) among a group of sugar cane genotypes in Venezuela. The amplified regions correspond to EST sequence of genes associated to the metabolisms of sucrose and proteins that transport sucrose with the aim of looking polymorphisms that might be present on these with the idea of using them in future crosses.

este trabajo se evaluó el potencial de los mismos para estimar la similitud genética (SG) entre un conjunto de genotipos de caña utilizados como progenitores en los programas de mejoramiento genético de caña de azúcar en Venezuela. Las regiones amplificadas, corresponden a secuencias EST de genes asociados al metabolismo de la sacarosa y a proteínas transportadoras de sacarosa, con el objetivo de buscar polimorfismos que puedan estar presentes en ellos a fin de aprovecharlos en futuros cruzamientos.

Con las 14 combinaciones realizadas, 7 iniciadores fijados y 2 arbitrarios, se obtuvieron 1303 bandas todas polimórficas cuyo tamaño osciló entre 84 y 760 pb con una media de 93 bandas por combinación de iniciadores (figura 1); siendo, al parecer, una característica de los marcadores TRAP el poder amplificar bandas de pequeño y gran tamaño simultáneamente (Hu y Vick, 2003; Alwala *et al.*, 2003; Arro, 2005). El mayor número de fragmentos (141) fue observado con la combinación StSy/Arbi2 y el menor (53) con la combinación Sut4/Arbi2. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Arro, 2005; Alwala *et al.*, 2006a; Alwala *et al.*, 2006b; Creste *et al.*, 2010), sin embargo se debe mencionar que también existen algunas diferencias con lo reportado por estos autores. Esto puede ser atribuido a que se usaron marcadores TRAPs diferentes y a que existen diferencias genéticas en la totalidad de los genomas explorados.

El alto nivel de polimorfismo encontrado puede atribuirse, a la compleja estructura genética de la caña de azúcar; y a que estos genotipos son al-

With the 14 combinations done, 7 fixed initiators and 2 arbitraries, 1303 polymorphic bands were obtained which size was from 84 to 760 pb with a mean of 93 bands per initiator combination (figure 1); apparently being a trait for the TRAP markers the power of amplifying small and big bands simultaneously (Hu and Vick, 2003; Alwala *et al.*, 2003; Arro, 2005). The highest number of fragments (141) was observed with the StSy/Arbi2 combination and the lowest (53) with the Sut4/Arbi2 combination. Similar results were obtained by other authors (Arro, 2005; Alwala *et al.*, 2006a; Alwala *et al.*, 2006b; Creste *et al.*, 2010); however, it must be mentioned that there are also some differences with the reported by these authors. This might be attributed to the fact that those authors used different TRAP markers and that there are genetic differences in all the genomes explored.

The high polymorphisms level found might be attributed to the complex genetic structure of sugar cane and also to the fact that these genotypes are highly heretozygous. Similar results have been described by Arro (2005), Alwala *et al.* (2006a), Creste *et al.* (2010) for these markers such as AFLP. This great complexity of this polyploid genome requires a growing number of informative markers that allow diverse applications in the genetic improvement of this specie (Singh *et al.*, 2010), where it is necessary to know the genetic relations among the progenitors for selecting more divergent parents and maximize the heterosis. In this case, this selection of genetically different parents might

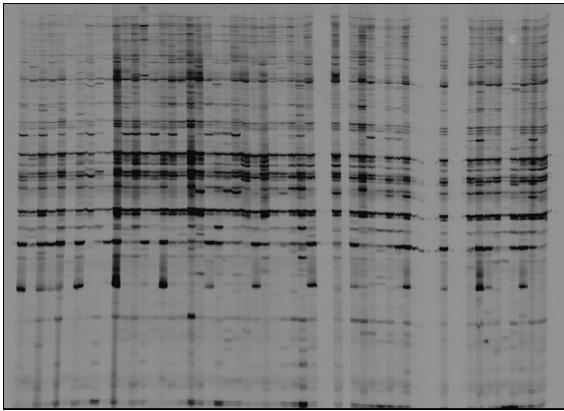


Figura 1. Patrón de bandas observadas en gel de poliacrilamida al 6% obtenido con los progenitores de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido) proveniente del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas utilizando la combinación de iniciadores SUPS/Arbi 2.

Figure 1. Band patterns observed in polyacrylamide gel at 6% obtained with the sugar cane progenitors (*Saccharum* spp. Hybrid) coming from the germplasm bank of the National Institute of Agricultural Research using the initiator combination SUPS/Arbi 2.

tamente heterocigóticos. Resultados similares para estos marcadores como AFLP han sido descrito por Arro (2005), Alwala *et al.* (2006a), Creste *et al.* (2010). Esta gran complejidad de este genoma poliploide, requiere entonces de un número creciente de marcadores informativos que permitan diversas aplicaciones en la mejora genética de esta especie (Singh *et al.*, 2010), donde es indispensable el conocimiento de las relaciones genéticas entre los progenitores para la selección de los padres más divergentes y así maximizar la heterosis. En este caso, esta selección de padres genéticamente diferentes puede basarse en el origen geográfico, las características agronómicas, y los datos genealógicos

be based on the geographic origin, the agronomic characteristics and the genealogic data reinforced by the data of the molecular markers.

One of the measures researchers have to know the usefulness of the molecular markers is the information of the polymorphic content (IPC), used to evaluate the discriminatory capacity of loci. It varies from 0 to 1 indicating a higher polymorphism or variation level when the value is closer to 1 (Botstein *et al.*, 1980; Tessier *et al.*, 1999). A high PIC value depends on the number of detectable alleles as well as its distribution and frequency. Our results indicate that the initiators used are mildly informative because none surpass the theoretical interval of 50%.

reforzados por los datos de los marcadores moleculares.

Una de las medidas con que contamos para conocer la utilidad de los marcadores moleculares es el contenido de información polimórfica (PIC), que es utilizado para evaluar la capacidad discriminatoria de los loci. Este varía entre 0 y 1, indicando un mayor nivel de polimorfismo o variación cuando el valor es más cercano a 1 (Botstein *et al.*, 1980; Tessier *et al.*, 1999). Un alto valor de PIC va a depender del número de alelos detectables, así como de su distribución y frecuencia. Nuestros resultados indican que los iniciadores utilizados son medianamente informativos porque ninguno supera el intervalo teórico del 50%. Sin embargo, los valores de esta medida estuvieron entre 0,25 para la combinación SPS/Arb3 y 0,31 para las combinaciones Sut4/Arb2 y Susy/Arb3; siendo estas dos últimas combinaciones, suficientes para determinar la variabilidad genética de todos los individuos. La probabilidad de que dos aislados diferentes tengan igual identidad es de $1,4 \times 10^{-14}$ obtenida con la combinación SAI/Arb3. La exploración de las regiones ETS con los marcadores TRAPs utilizados permiten discriminar 10^{177} genotipos de caña de azúcar de manera simultánea. El cuadro 2 contiene la información general de la estadística descriptiva para los marcadores TRAPs empleados.

Aunque el número de fragmentos polimórficos fue elevado (1303), no se observaron alelos privados o particulares para ningún cultivar y el gran número de bandas comunes sugeriría asociaciones muy antiguas entre los genotipos estudiados. Esto puede deber-

However, the values of this measure ranked from 0.25 for the SPS/arb3 combination to 0.31 for the Sut4/Arb2 and Susy/Arb3; being the last two combinations enough to determine the genetic variability of all the individuals. The probability that two different isolates have the same identity is of 1.4×10^{-14} obtained with the SAI/Arb3 combination. The exploration of the ETS regions with the TRAPs markers used allow discriminating 10^{177} genotypes of sugar cane simultaneously. Table 2 has the general information of the descriptive statistics for the TRAPs markers used.

Even though the number of polymorphic fragments was high (1303), none private or particular alleles were observed for any cultivar, and the elevate number of common bands would suggest very old associations among the genotypes studied. This might be due to the fact that these genotypes have common ancestors and were possibly submitted to a strong selection pressure for the sucrose content as reported by Creste *et al.* (2010) in a collection of 53 genotypes of cane of the Agronomic Institute of Campiñas of Brazil. Therefore, this has caused a low effectiveness of crosses to obtain new genetic materials with the adequate sugar requirements for the sugar industry.

The genetic similitude and the relations among the genotypes of this research are represented in figure 1, which shows the bidimensional space obtained on the Main Coordinates Analysis (ACoP), the two first dimensions explain 19.74% of the total variability and allow the formation

Cuadro 2. Polimorfismo y capacidad discriminatoria en caña de azúcar usando marcadores TRAP a nivel de genes de sacarosa.

Table 2. Polymorphisms and discriminatory capacity in sugar cane using TRAP markers at the level of sucrose genes.

Iniciador fijado	Iniciador arbitrario	Rango de amplificación (pb)	Fragmentos amplificados totales y polimórficos	Contenido de información polimórfica(PIC)	Probabilidad de igual identidad ¹
PODK	Arbi 2	120-580	62	0,27	1,4x10 ¹²
	Arbi 3	130-550	71	0,30	1,8x10 ¹³
SAI	Arbi 2	100-665	105	0,28	1,4x10 ¹⁴
	Arbi 3	115-620	94	0,28	3x10 ¹²
SPS	Arbi 2	185-760	84	0,28	2,3x10 ¹⁴
	Arbi 3	100-705	90	0,25	1,6x10 ¹²
STSY	Arbi 2	90-725	141	0,30	7,6x10 ¹⁴
	Arbi 3	92-675	114	0,29	1,9x10 ¹³
SUPS	Arbi 2	118-670	104	0,30	4,9x10 ¹³
	Arbi 3	84-650	92	0,30	3,8x10 ¹²
SUSY	Arbi 2	108-665	108	0,27	7,7x10 ¹⁴
	Arbi 3	110-680	105	0,31	3,5x10 ¹³
SUT4	Arbi 2	150-570	53	0,31	2,2x10 ¹⁴
	Arbi 3	115-550	80	0,29	4,2x10 ¹³
Total		1303			2,6x10 ¹⁷⁷

¹Probabilidad de que dos aislados para el *locus* evaluado tengan igual identidad

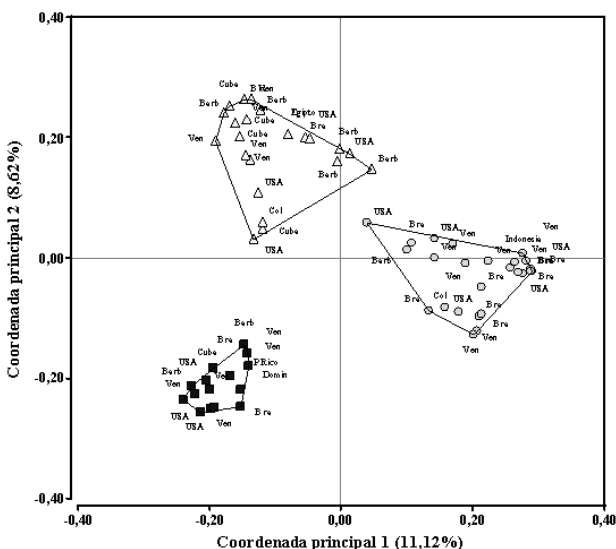
se al hecho de que estos genotipos tienen ancestros comunes y posiblemente fueron sometidos a una fuerte presión de selección para el contenido de sacarosa, como han sido reseñados por Creste *et al.* (2010) en una colección de 53 genotipos de caña del Instituto Agronómico de Campiñas de Brasil. Por lo tanto, esto ha traído como consecuencia una baja efectividad de los cruzamientos para obtener nuevos materiales genéticos con los requerimientos de azúcar adecuados para la industria azucarera.

La similitud genética y las relaciones entre los genotipos de este estudio se representan en la figura 2, que muestra el espacio bidimensional obtenido del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), las dos primeras dimensiones explican el 19,74% de la variabilidad total y permiten la formación de tres grupos de genotipos, en los cuales los individuos son proyectados sin un patrón asociado a su procedencia similar a los resultados encontrados con marcadores RAPD por Alejandre *et al.* (2010).

El primer grupo formado por los genotipos: B80-408, B81509, C86-503, CP721210, CP722086, CP742047, CR74250, PR61632, SP716163, SP791011, V00-50, V98-76, V98-80, V99-236 y V99-245, el segundo grupo formado por los genotipos: B66-130, B67-49, B74-118, B81-219, B82-11, C137-81, C266-70, C32368, C88-382, CB4053, CC85-92, CP31588, CP67412, CP701527, CP811384, G107, RB855035, V84-8, V92-5, V98-120, V98-62 y V98-95 y el tercer grupo formado por los genotipos: B75-403, CP52-68, CP751082, IAC823092, IAC862210, L62-96, LCP82-89, LCP86384,

of three groups of genotypes in which the individuals are projected without any associated pattern to the origin, similar to the results found with RAPD markers by Alejandre *et al.* (2010).

The first group formed by the genotypes: B80-408, B81509, C86-503, CP721210, CP722086, CP742047, CR74250, PR61632, SP716163, SP791011, V00-50, V98-76, V98-80, V99-236 and V99-245, the second group formed by the genotypes: B66-130, B67-49, B74-118, B81-219, B82-11, C137-81, C266-70, C32368, C88-382, CB4053, CC85-92, CP31588, CP67412, CP701527, CP811384, G107, RB855035, V84-8, V92-5, V98-120, V98-62 and V98-95 and the third group formed by the genotypes: B75-403, CP52-68, CP751082, IAC823092, IAC862210, L62-96, LCP82-89, LCP86384, MZC7425, NCO310, POJ2878, RB835087, SP701284, SP711406, SP715574, SP724928, SP801-816, V02-47, V60-4, V71-39, V71-4, V71-68, V75-5, V78-1 and V98-169, with a mean genetic similitude of 0.5100 ± 0.0069 , 0.4939 ± 0.0057 , 0.4798 ± 0.0057 , polymorphic loci of 0.7542, 0.7991, 0.77435 and a representation quality measured with the first two dimensions of 100% for the first, second and third group, respectively. Even though these initiators were divided into three groups, these do not have any relation with their origin, suggesting a common origin and a high hybridization degree among them, probably due to the interchange of material among the different places or countries. These results agree to what was found by Khan *et al.* (2009) and Alejandre *et al.* (2010) saying that the genetic diversity



Los diagramas de contorno muestran los grupos obtenidos utilizando las dos primeras coordenadas principales retenidas. ■ Grupo 1, ▲ Grupo 2 y ● Grupo 3.

Figura 2. Relaciones genéticas entre los 62 genotipos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido) basada en la disimilaridad debida al coeficiente de Dice y 14 combinaciones de iniciadores TRAP.

Figure 2. Genetic relations among the 62 genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp. Hybrid) based on the dissimilarity caused by the Dice coefficient and 14 combinations of TRAP initiators.

MZC7425, NCO310, POJ2878, RB835087, SP701284, SP711406, SP715574, SP724928, SP801-816, V02-47, V60-4, V71-39, V71-4, V71-68, V75-5, V78-1 y V98-169, con una similitud genética media de $0,5100 \pm 0,0069$, $0,4939 \pm 0,0057$, $0,4798 \pm 0,0057$, loci polimórficos de 0,7542, 0,7991, 0,77435 y una calidad de representación calculada con las dos primeras dimensiones de 100%, para el primero, segundo, y tercer grupo, respectivamente. Aún cuando con estos iniciadores hayamos podido separar a los genotipos en 3 grupos, estos no guardan relación con su

among the clones used in breeding is low.

Figure 3 shows the genetic diversity among the groups. These results indicate that in spite of the low genetic diversity among the groups, there are significant differences in between ($P < 0.05$) according to the multiple comparisons for the non parametric test of Friedman (Balzarini *et al.*, 2010). The data show that two groups do not present statistical differences among them (group 1 and group 3); however, these allow suggesting that the genotypes on the

lugar de procedencia, sugiriendo un origen común y un alto grado de hibridación entre ellos; probablemente debido al intercambio de material entre los diferentes lugares o países. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Khan *et al.* (2009) y Alejandre *et al.* (2010) respecto a que la diversidad genética entre los clones utilizados en mejoramiento genético es baja.

La figura 3, muestra la diversidad genética entre los grupos. Estos resultados indican que a pesar de que la diversidad genética entre grupos es baja, existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ellos de acuerdo a las comparaciones múltiples para la prueba no paramétrica de Friedman (Balzarini *et al.*, 2010). Los datos muestran que dos grupos no presentan diferencias estadísticas entre ellos (grupo 1 y grupo 3); sin embargo, los mismos permiten sugerir que los genotipos contenidos en los grupos más

more separated groups: groups 1 and 2 and groups 2 and 3, are the appropriate candidates for guided crosses.

Considering that it is expected a reduction of the genetic diversity of sugar cane since it is a domesticated specie from a long time ago (Gepts, 2004; Zeder *et al.*, 2006), the results obtained would allow a more efficient use of the progenitors to perform the crosses among the most divergent groups or individuals.

Conclusions

The knowledge of the quantity and distribution of the genetic variation on the collection of sugar cane clones regarding the genes related to the sucrose would contribute to the success of breeding programs. Even when the variability seems narrow it might be optimized in future crosses with the

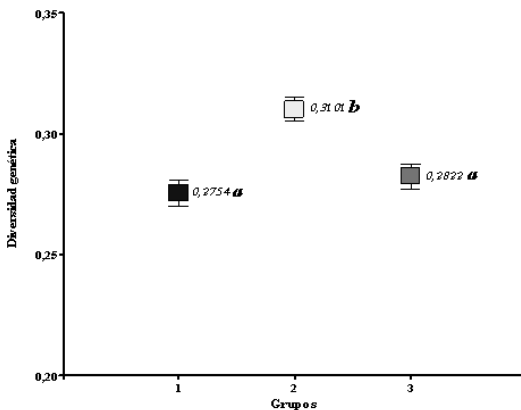


Figura 3. Diversidad genética entre los grupos evaluada con marcadores TRAP; Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3.

Figure 3. Genetic diversity among the groups evaluated with TRAP markers: Group 1, Group 2 and Group 3.

separados: grupos 1 y 2 y grupos 2 y 3, son candidatos apropiados para realizar cruces dirigidas.

Teniendo en cuenta que es de esperarse una reducción de la diversidad genética de la caña de azúcar debido a que es una especie domesticada desde hace mucho tiempo (Gepts, 2004; Zeder *et al.*, 2006), los resultados obtenidos permitirían hacer un uso más eficiente de los progenitores al dirigir los cruces entre los grupos o individuos más divergentes.

Conclusiones

El conocimiento de la cantidad y distribución de la variación genética dentro de la colección de clones de caña de azúcar con respecto a genes relacionados con la sacarosa contribuirá al éxito de los programas de mejoramiento genético. Aun cuando, la variabilidad pareciera estrecha, ésta puede ser optimizada en futuras cruces con fines de i) obtener mayor variabilidad o en cruces dirigidos a incrementar el contenido de azúcar en la obtención nuevos cultivares y ii) desarrollar estrategias futura de selección asistida por marcadores de utilidad en la producción de nuevas variedades.

Literatura citada

Alejandro, J., M. Galindo, H. Lee y O. Alvarado. 2010. Variabilidad genética en 22 variedades híbridas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido). FYTON. 79: 87-94.

Alwala, S., S. Andru, J. Arro y C. Kimbeng. 2006a. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. Crop Science. 46: 448-455.

aim of i) obtaining higher variability or in crosses committed to increase the sugar content in the obtaining of new cultivars and ii) develop future assisted selection strategies per benefit markers in the production of new varieties.

End of english version

Alwala, S., C. Kimbeng, K. Gravois y K. Bischoff. 2006b. TRAP, a new tool for sugarcane breeding: comparison with AFLP and coefficient of parentage. Journal of American Society Sugar Cane Technologists. 26: 62-86.

Alwala, S., S. Andru, J. Arro y C. Kimbeng. 2003. Target region amplification polymorphism (TRAP) markers for sugarcane genotyping. Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists. 24: 105.

Andru, S., Y. Pan, S. Thongthawee, D. Burner y C. Kimbeng. 2011. Genetic analysis of the sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar 'LCP85-384'. I. Linkage mapping using AFLP, SSR, and TRAP markers. Theoretical and Applied Genetics. 123(1):77-93.

Arro, J. 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, LA.

Balzarini M., C. Bruno, A. Peña, I. Teich, y J. Di Rienzo. 2010. Estadística en Biotecnología: Aplicaciones en Info-Gen. Ed. Grupo de Editores. Córdoba, Argentina. p. 277

Botstein, D., R. White, M. Skolnick y R. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetic. 32: 314-331.

Calsa-Junior T. 2005. Análise transcricional de folha e parênquima de colmo de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) contrastantes para

- teor de sacarose e estagio de maturacaõ por meio serial (SAGE). PhD Thesis. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de Saõ Paulo, Piracicaba.
- Creste, S., K. Accoroni, L. Pinto, R. Vencovsky, M. Gimenes, M. Xavier y M. Landell. 2010. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose metabolism and drought tolerance genes. *Euphytica*. 172: 435-446.
- Da Silva, J. y J. Bressiani. 2005. Sucrose synthase molecular marker associated with sugar content in elite sugarcane progeny. *Genetics and molecular Biology*. 28(2): 294-298.
- Demey, J., J. Vicente-Villardón, M. Galindo-Villardón y A. Zambrano. 2008. Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by External Logistic Biplots. *Bioinformatics*. 24: 2832-2838.
- Demey, J., A. Zambrano, F. Fuenmayor y V. Segovia. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *Interciencia*. 28(12): 684-689.
- De Sousa-Vieira, O., R. Briceño, A. Díaz, R. Rea, M. Niño, A. Rivero, G. Aza, A. Ortiz y J. George. 2008. Programa venezolano de desarrollo de variedades de caña de azúcar. INIA HOY. Edición 1:1-8.
- FEDERAGRO. 2012. Estadísticas Agrícolas. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/agricola/default.asp>
- Gepts, P. 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. En: Jules Janick (ed). *John Wiley & Sons, Inc. Plant Breeding Reviews*. 24: 1-44.
- Hu, J. y B. Vick. 2003. Target Region Amplification Polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*. 21(3): 289-294.
- Khan, F., S. Bibi, S. Yasmeen, N. Seema, A. Khatri, M. Siddiqui, G. Nizamani y S. Afgani. 2011. Identification of elite sugarcane clones through trap. *Pak. J. Bot.* 43(1): 261-269.
- Khan, F., A. Khan, F. Azhar y S. Rauf. 2009. Genetic diversity of *Saccharum officinarum* accessions in Pakistan as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Genetics and Molecular Research*. 8: 1376-1382.
- Rea, R., O. De Sousa y V. González. 1994. Caracterización de catorce variedades promisorias de caña de azúcar en Venezuela. *Caña de Azúcar*. 12(1): 3-45.
- Singh, R., S. Mishra, S. Singh, N. Mishra y M.L. Sharma. 2010. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. *Australian Journal of Crop Science*. 4(2):116-125.
- Sneath, P. y R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. En: Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman W.H. and Company, San Francisco, USA. 573pp.
- Soltis, D. E. y P. Soltis. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 12: 12-243.
- Suman A., A. Kazim, J. Arro, A. Parco, C. Kimbeng y N. Baisakh. 2012. Molecular diversity among members of the *Saccharum* complex assessed using TRAP markers based on lignin-related genes. *Bioenergy Research*. 5(1): 197-205.
- Tessier, C., J. David, P. This, J. Boursiquot y A. Charrier. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 171-177.
- Zeder, M., E. Emshwiller, B. Smith y D. Bradley. 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archeology. *Trends in Genetics*. 22: 138-155.