

## Variación genética e identificación de cultivares cubanos de caña de azúcar mediante RFLP.

**Eduardo Canales, Orlando Coto y María Teresa Cornide**

Dpto. de Bioplantas, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Playa. Apdo. 6412. Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfono: 271 2146. Correo electrónico: canales@biocnic.cneuro.edu.cu

Recibido: 14 de septiembre de 2002

Aceptado: 9 de diciembre del 2002

**Palabras claves:** diversidad genética, identificación, RFLP, caña de azúcar, *Saccharum*.

**Key words:** genetic diversity, cultivar identification, RFLP, sugarcane, *Saccharum*.

### RESUMEN

El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) fue utilizado para estimar la diversidad molecular de un grupo de clones de caña de azúcar y determinar los fondos genéticos con vistas a auxiliar su elección como progenitores, así como determinar los patrones RFLP que permitan la identificación rápida y precisa de las variedades cubanas de mayor uso en el mejoramiento. Un total de 45 genotipos de caña de azúcar fueron estudiados, incluyendo 4 somaclones y 23 variedades cubanas. Se determinó el polimorfismo revelado por 35 combinaciones enzima/sonda (CES), producto de la utilización de 12 sondas genómicas de maíz y caña de azúcar en combinación con 4 enzimas de restricción. De las 239 bandas identificadas, el 84.5% fueron polimórficas y el número promedio de bandas por CES fue de 5.8. Todas las sondas fueron polimórficas, siendo la combinación EcoR I – UMC114 la que permitió identificar el mayor número de genotipos. Se encontraron 117 bandas parcialmente asociadas dentro de una misma CES, mientras que 115 bandas mostraron asociación parcial entre CES diferentes utilizando la misma sonda. El empleo de una CES por sonda utilizando la enzima más polimórfica y el menor número de bandas correlacionadas permitió aumentar el número promedio de bandas por genotipo, sin embargo el agrupamiento obtenido con ambos estimados es altamente coincidente. Los 45 genotipos fueron agrupados en 6 genofondos de diversidad molecular, evidenciándose la alta similitud genética de las variedades cubanas al estar representadas fundamentalmente en dos genofondos.

### ABSTRACT

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used to estimate molecular diversity and determine genetic pools in a group of sugarcane cultivars, directed to progenitor election, and to determine RFLP patterns more suitable for a precise identification of Cuban varieties more used in breeding. Forty five genotypes of sugarcane were studied, including 4 somaclones and 23 Cuban varieties. Polymorphism revealed by 35 probe/enzyme combinations (PEC) from 12 genomic maize and sugarcane probes in combination with 4 restriction enzyme was examined. From 239 identified bands, 84.5% were polymorphics with an average of 5.8 band per PEC. All probes showed polymorphism, while EcoR I – UMC114

combination was the most suitable for fingerprinting. One hundred and seventeen bands partially associated within the same PEC were found, while 115 bands showed partial association among different PECs from the same probe. The average number of bands per genotype was high when one PEC per probe was employed, using the enzyme that showed more polymorphism and less number of correlated bands, however, grouping resulting from both estimates was highly coincident. The 45 genotypes were grouped in 6 molecular diversity groups, with the Cuban varieties represented mainly in 2 groups, as evidence of their high genetic similarity.

### INTRODUCCIÓN

Los cultivares actuales de caña de azúcar son híbridos entre unos pocos clones de las especies *S. officinarum* y *S. spontaneum* fundamentalmente, de los cientos de estos de diferentes especies que han sido colectados y que se conservan en las colecciones de distintas estaciones de mejoramiento.<sup>1</sup> Esta estrecha base genética, unido a la elevada consanguinidad entre los híbridos comerciales usados como progenitores en los programas de obtención de variedades comerciales, son causas que limitan el progreso en los programas de mejora de la caña de

azúcar y apuntan la necesidad de su ampliación y uso eficiente.<sup>2</sup> Para contrarrestar esta situación se han retomado los trabajos de nobilitación en numerosas estaciones a partir de los años 60, y más recientemente se han utilizado clones pertenecientes a los géneros *Erianthus spp.* y *Miscanthus spp.* como fuentes silvestres de nueva variabilidad.<sup>3</sup>

Se han propuesto diferentes indicadores para estimar la diversidad, los más comúnmente empleados son los basados en los datos fenotípicos y genealógicos, y más recientemente en el polimorfismo de los marcadores moleculares.

El uso de las isoenzima y de los marcadores del polimorfismo del ácido desoxirribonucleico (ADN), ha sido descrito en muchas especies de plantas, contribuyendo al aumento en la eficiencia de los programas de mejoramiento. Entre las ventajas de estos últimos como herramientas auxiliares en la caracterización de genotipos están su número ilimitado, permitiendo una mayor cobertura del genoma y su expresión independiente del efecto de interacción genotipo-ambiente.

Una de las aplicaciones más importante de los marcadores moleculares es auxiliar la elección tradicional basada en caracteres fenotípicos mediante estimados de la diversidad genética basados en el polimorfismo del ADN. Para estos fines es necesario determinar un método eficaz que determine los genofondos de diversidad. En la caña de azúcar los marcadores moleculares están siendo empleados para estudiar las relaciones filogenéticas, la estructura del genoma y la determinación de genofondos comunes de miembros del complejo *Saccharum*,<sup>4,7</sup> la construcción de mapas de ligamiento y la localización de marcadores asociados a caracteres agromorfológicos.<sup>8-13</sup>

Sobre la base de los fundamentos anteriores, el presente trabajo tuvo como objetivos:

1) Estimar la diversidad molecular de un grupo de clones de caña de azúcar usados comúnmente en el programa de hibridación en Cuba y determinar los fondos genéticos con vistas a auxiliar su elección como

progenitores, empleando el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

2) Determinar los patrones RFLP que permitan la identificación rápida y precisa de las variedades cubanas de mayor uso en el mejoramiento cañero en el país.

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

Fueron estudiados un total de 45 genotipos de caña de azúcar (Tabla 1). Estos incluyen 4 somaclones (1, 2, 4 y 5) obtenidos a partir de la variedad C 87-51 por cultivo de tejidos *in vitro*,<sup>14</sup> 23 variedades cubanas y otros híbridos comerciales usualmente empleados como progenitores en el programa varietal de la caña de azúcar en Cuba.

El material estudiado fue obtenido del banco de germoplasma de la Estación Provincial de Investigaciones de Matanzas, del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA).

### Análisis del RFLP.

El ADN genómico total fue extraído a partir de hojas liofilizadas de cada genotipo, de acuerdo a Hoisington<sup>15</sup>. El ADN (10 µg) fue digerido con las enzimas de restricción Hind III, BamH I, EcoR I y Xho I, según las recomendaciones del suministrador (Amersham). Se utilizó como marcador de peso molecular el ADN del fago λ digerido con la enzima Hind III. Las electroforesis de los fragmentos se llevaron a cabo en geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1x (40 mM Tris acetato, 1mM EDTA) y posteriormente, estos fueron transferidos a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) mediante transferencia alcalina (0.4 N NaOH).

Se emplearon 35 combinaciones enzima/sonda (CES) reveladas por sondas genómicas de copia simple de maíz y caña de azúcar (Tabla 2) y las 4 enzimas de restricción ya mencionadas, las cuales fueron seleccionadas para este estudio atendiendo a su polimorfismo y facilidad de evaluación. Estas fueron amplificadas usando procedimientos de PCR estándar y marcadas por el método de cebadores al azar<sup>16</sup>

empleando el kit Megaprime DNA Labelling Systems de Amersham y usando el isótopo radiactivo [<sup>32</sup>P] dATP. La hibridación se realizó a 65°C en un horno de hibridación, según el protocolo empleado por Hoisington.<sup>15</sup>

### Análisis de los datos

#### Diversidad revelada por los RFLP

Las distancias genéticas, calculadas como el complemento de la similitud (1 - S<sub>ij</sub>), fueron estimadas a partir de todos los datos de RFLP generados de 35 CES previamente seleccionadas por producir patrones de hibridación con bandas fuertes y bien resueltas, considerando cada banda polimórfica individual (DB<sub>1</sub>). Las bandas polimórficas se evaluaron de forma binaria (presencia = 1 y ausencia = 0). El polimorfismo fue cuantificado usando la fórmula de similitud genética.<sup>17</sup>

$$S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$$

donde:

S<sub>ij</sub>: estimado de la similitud genética entre el par ij de genotipos

N<sub>ij</sub>: número de variantes compartidas por los genotipos (i) y (j) N<sub>i</sub>,

N<sub>j</sub>: número de variantes presentes en los genotipos (i) y (j), respectivamente.

La asociación entre las bandas de cada CES y entre las bandas de CES reveladas por la misma sonda fue evaluada mediante la correlación lineal simple según el coeficiente de Pearson (P<0.05) utilizando el paquete estadístico MICROSTAT.<sup>18</sup>

Se seleccionó una CES por cada sonda sobre la base del mayor polimorfismo y el menor número de bandas parcialmente correlacionadas. Con las 12 CES seleccionadas fue calculado el estimado de distancia DB<sub>2</sub> de forma similar a la descrita para DB<sub>1</sub>. Los estimados de distancia fueron comparados entre sí por medio del coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r<sub>s</sub>) (P<0.05) mediante el paquete STATITFC.<sup>19</sup>

El agrupamiento de los genotipos fue determinado por medio de análisis de conglomerados empleando el algoritmo del ligamiento completo aplicado a la matriz de distancias euclidianas para ambos estimados de distancia (DB<sub>1</sub> y DB<sub>2</sub>).<sup>20</sup>

**Tabla 1.** Lista de los 45 genotipos analizados en este estudio.

Código	Nombre	Código	Nombre	Código	Nombre
1	CC 83-1	16	C 389-52	31	C 187-68
2	CC 82-105	17	C 15794	32	C 120-78
3	C 87-51	18	C 431-62	33	C 227-59
4	CC 84-56	19	B 37161	34	C 97-59
5	CC 84-74	20	B 4362	35	C 1616-75
6	C 266-70	21	BH 10/12	36	Ja 55-663
7	Ja 60-5	22	Co 421	37	Ja 64-11
8	<b>C 323-68</b>	23	Co 312	38	My 54129
9	Ja 64-19	24	POJ 2725	39	My 5778
10	B 42231	25	POJ 2878	40	PR 980
11	My 5514	26	Kassoer	41	CL 41-142
12	C 883-83	27	CP 29-116	42	CP 52-43
13	C 863-54	28	Ja 34-16-23	43	Co 281
14	C 45-52	29	US 1694	44	Q 33
15	C 1051-73	30	PSA 96	45	B 45181

**Tabla 2.** Sondas utilizadas en el trabajo.

Sonda	Grupo de ligamiento <sup>10</sup>	Sonda	Grupo de ligamiento
	Ia Xb	SSCIR107	VIII
SSCIR60	III	SSCIR119	III
SSCIR69	I	SSCIR194	VII
SSCIR73	I	SSCIR230	VIa Xb
SSCIR76	IX	UMC44	VIII
	VIII	UMC114	IX

BNL: sonda genómica de maíz del Laboratorio Nacional de Brookhaven  
 UMC: sonda genómica de maíz de la Universidad de Missouri, Columbia  
 SSCIR: sonda genómica de *Saccharum spontaneum* del CIRAD

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Caracterización molecular (RFLP) de un grupo de progenitores de caña de azúcar.

#### Polimorfismo revelado

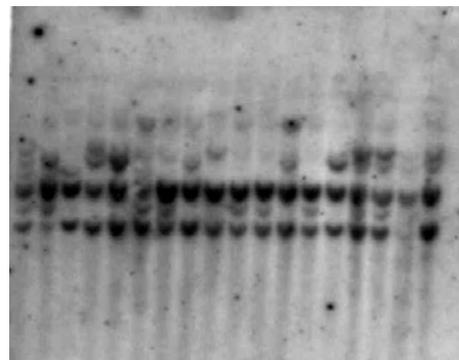
El empleo de las 35 combinaciones enzima/sonda permitió identificar un total de 239 bandas, de las cuales el 84.5% fueron polimórficas. En la tabla 3 se muestra además el número total de patrones RFLP obtenidos para cada CES, así como el número de patrones únicos (con representación en un solo genotipo).

Todas las sondas revelaron polimorfismo. La mayor parte de las CES mostraron un alto polimorfismo, acorde con la naturaleza poliploide compleja del genoma de la caña de azúcar. Considerando las 35 CES fueron identificados de 2 a 12 fragmentos polimórficos por combinación, con un promedio de 5.8.

Para identificar los distintos genotipos se recomienda usar las CES con un mayor número de patrones únicos: la CES EcoR I – UMC 114 (Fig. 1) que permite identificar 31 de los 45 genotipos; y la CES Hind III – SSCIR 73 que conjuntamente con la anterior permiten la identificación de 43 de los genotipos estudiados.

El uso de estos datos como descriptores moleculares, teniendo en cuenta el alto polimorfismo mostrado por los RFLP, ha sido aceptado para adicionarse a la base de datos que contempla la descripción fenotípica de las distintas accesiones que componen el Banco de Germoplasma de la Caña de Azúcar en Cuba (BANCOGER).<sup>21</sup>

Fue posible detectar diferencias, por pérdida o ganancia de nuevos fragmentos, entre los somaclones y la variedad donante C 87-51,



**Figura 1.** Patrones de RFLP de variedades de caña de azúcar revelados por la CES EcoR I – UMC114.

En las especies poliploides, en especial las de origen híbrido, una misma sonda puede hibridar con loci situados en varios cromosomas. En este trabajo se encontraron 117 bandas parcialmente asociadas a 1 ó más bandas de la misma CES (Tabla 4). Correlaciones positivas y negativas fueron igualmente frecuentes. La alta proporción de variantes polimórficas parcialmente correlacionadas dentro de una CES puede ser considerado una evidencia de la presencia de fragmentos de dosis múltiple en la caña de azúcar. Resultados similares han sido reportados por otros autores.<sup>22,23</sup>

La efectividad de uso de una sonda en combinación con diferentes enzimas de restricción es discutida. Van Deynze y col.<sup>24</sup> reportaron un aumento del polimorfismo de 74% a 93% mediante el uso de 2 a 6 enzimas de restricción diferentes. Song y col.<sup>25</sup> no encontraron diferencias significativas entre 10, 20 y 30 sondas para separar grupos muy diversos, pero sí encontraron diferencias para separar las accesiones dentro de los grupos, o sea, que el número de sondas necesarias dependerá de la diversidad genética existente entre los genotipos estudiados. Además sugirieron que cuando se emplean pocas sondas en el análisis, el uso de enzimas adicionales puede proveer tanta información nueva como el uso de sondas adicionales. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que el polimorfismo revelado por diferentes combinaciones de una misma sonda con diferentes enzimas ofrece resultados redundan-

tes y conducen a agrupamientos similares de los genotipos por su diversidad en diferentes plantas: *Brassica*,<sup>26</sup> maíz,<sup>27</sup> arroz<sup>28,29</sup> y caña de azúcar.<sup>30</sup> No obstante esto, cabe esperar un mayor polimorfismo asociado a genes de interés mejora-

dor, si se aumenta el número de combinaciones enzima-sonda a expensas de un mayor número de sondas que monitoreen zonas diferentes del genoma estudiado. En el presente estudio el polimorfismo revelado por una sonda

varió según la enzima de restricción utilizada (Tabla 3). Por ejemplo, la sonda SSCIR 119 detectó 12 bandas polimórficas cuando se usa la enzima BamH I y sólo 2 bandas con la enzima EcoR.

**Tabla 3.** Número de bandas y patrones detectados mediante las CES evaluadas.

Sonda	Enzima	Bandas		Patrones		No. medio de bandas/ individuo
		Totales	Polimorf.	Totales	Únicos	
<b>BNL 8.39</b>	BamH I	6	5	11	5	3.91
SSCIR 60	Hind III	8	7	24	13	4.42
SSCIR 60	BamH I	5	4	11	3	3.42
SSCIR 60	EcoR I	9	8	23	11	4.87
SSCIR 60	Xho I	4	3	7	1	3.09
SSCIR 69	Xho I	8	4	9	1	6.44
SSCIR 73	Hind III	11	11	34	27	5.44
SSCIR 73	EcoR I	6	5	15	5	5.76
SSCIR 73	Xho I	7	3	8	2	4.87
SSCIR 76	Hind III	8	8	20	10	3.82
SSCIR 76	BamH I	4	4	14	4	2.0
SSCIR 76	EcoR I	10	9	26	17	4.0
SSCIR 76	Xho I	5	4	8	1	3.82
SSCIR 92	BamH I	2	2	3	0	1.09
SSCIR 92	EcoR I	4	2	4	0	1.8
SSCIR 92	Xho I	9	9	19	11	2.24
SSCIR 107	Hind III	4	3	5	1	2.22
SSCIR 107	EcoR I	9	9	21	11	3.0
SSCIR 107	Xho I	4	4	11	2	1.51
SSCIR 119	Hind III	8	7	23	12	4.0
SSCIR 119	BamH I	12	12	34	24	6.13
SSCIR 119	EcoR I	5	2	3	0	4.55
SSCIR 119	Xho I	3	3	5	1	2.24
SSCIR 194	Hind III	3	2	3	1	2.93
SSCIR 194	BamH I	13	11	26	19	5.69
SSCIR 194	EcoR I	7	6	13	4	3.44
SSCIR 230	Hind III	6	5	20	8	4.04
SSCIR 230	BamH I	9	8	32	23	4.6
UMC 44	Hind III	10	9	17	12	3.84
UMC 44	BamH I	2	1	2	0	1.44
UMC 44	EcoR I	6	4	9	4	3.42
UMC 44	Xho I	6	5	8	2	2.18
UMC 114	Hind III	5	4	7	2	2.58
UMC 114	EcoR I	13	12	38	31	8.4
UMC 114	Xho I	8	7	25	11	5.8
<b>TOTAL</b>		<b>239</b>	<b>202</b>	<b>538</b>	<b>277</b>	
<b>Promedio</b>		<b>6.82</b>	<b>5.77</b>	<b>15.37</b>	<b>7.91</b>	<b>3.82</b>

Cuando se analizaron las correlaciones de bandas obtenidas por el uso de una misma sonda con varias enzimas de restricción, se obtuvo que 115 bandas mostraron asocia-

ción parcial con una o más bandas de otra CES de la misma sonda (Tabla 5). En efecto, la misma sonda de ADN en combinación con diferentes enzimas, debe reconocer

la misma región genómica, revelando variantes correlacionadas entre sí. Esto ha sido planteado por otros autores como Mesmer y col.<sup>31</sup>

**Tabla 4.** Número de bandas polimórficas correlacionadas dentro de una misma CES.

Sondas	Enzimas de Restricción			
	BamH I	Hind III	EcoR I	Xho I
BNL 8.39	4	-	-	-
SSCIR 60	0	0	6	0
SSCIR 73	-	9	2	2
SSCIR 76	0	5	6	2
SSCIR 92	0	5	0	-
SSCIR 107	-	2	3	4
SSCIR 119	7	5	0	0
SSCIR 194	10	0	4	0
SSCIR 230	7	2	-	-
UMC 44	-	7	2	5
UMC 114	-	2	12	4

(-): combinaciones enzima/sonda no efectuadas

**Tabla 5.** Número de bandas polimórficas correlacionadas entre diferentes CES con la misma sonda.

Sondas	CES					
	Hind III - BamH I	Hind III - EcoR I	Hind III - Xho I	BamH I - EcoR I	BamH I - Xho I	EcoR I - Xho I
SSCIR 60	3	8	2	3	4	2
SSCIR 73	-	9	5	-	-	2
SSCIR 76	4	14	3	2	4	8
SSCIR 92	-	-	-	1	-	-
SSCIR 107	-	5	3	-	-	4
SSCIR 119	11	3	0	1	2	0
SSCIR 194	4	2	-	5	-	-
SSCIR 230	4	-	-	-	-	-
UMC 44	1	4	13	0	1	2
UMC 114	-	2	1	-	-	13

(-): CES no efectuada con alguna de las dos sondas.

**Diversidad entre los progenitores**

En la tabla 6 se presentan las 12 CES seleccionadas de acuerdo a su poder discriminatorio, su polimorfismo y al menor número de bandas parcialmente correlacionadas, las cuales fueron empleadas para el cálculo de DB<sub>2</sub>. El número promedio de fragmentos por genotipos (4.36) es ligeramente superior con relación a las 35 CES previamente empleadas

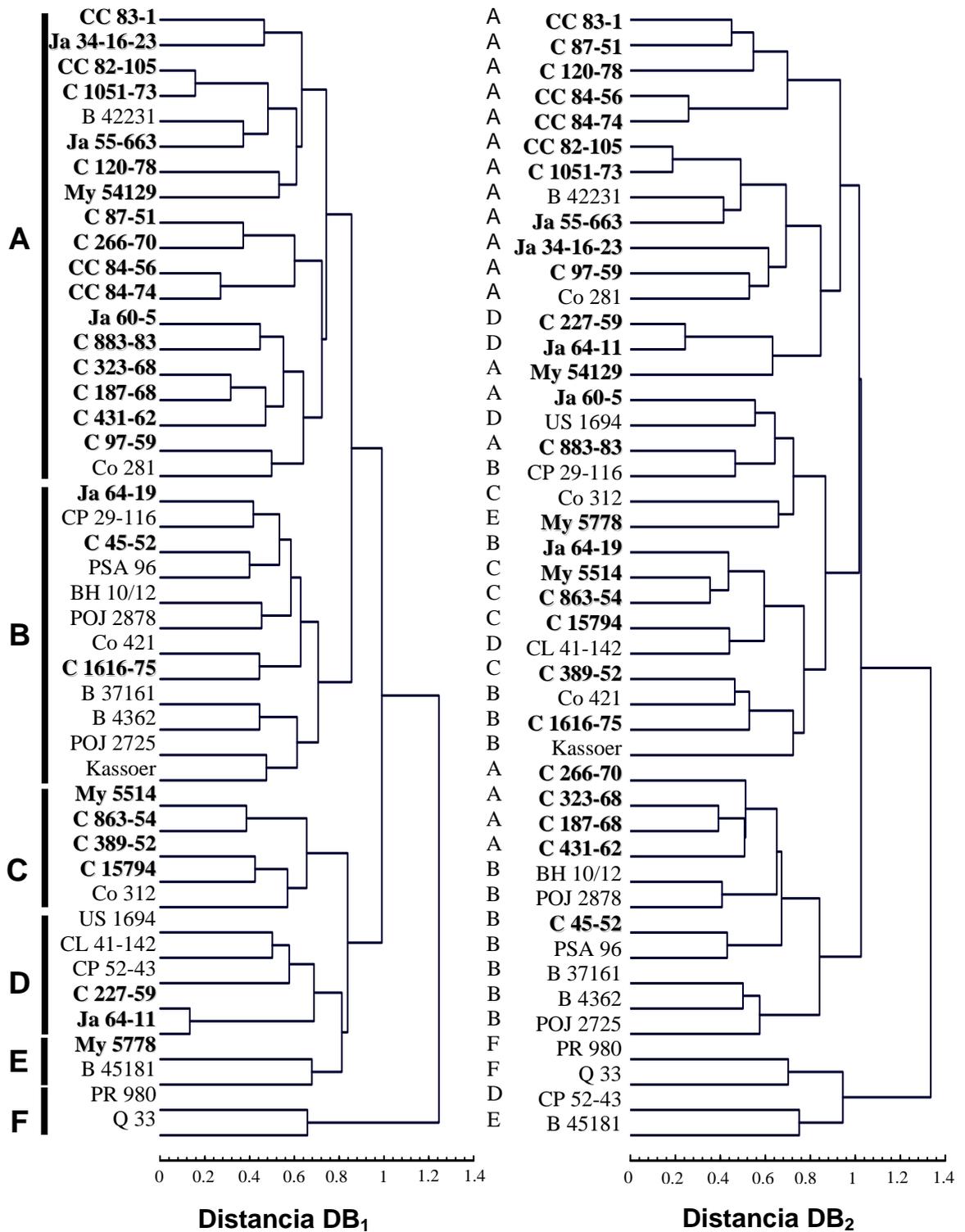
y menor que el reportado por Lu y col.<sup>30</sup> Estos autores lograron un número promedio de fragmentos por genotipos de 7.28 considerando 22 sondas con una enzima y 40 variedades; un valor menor (5.99) fue mostrado por un grupo de 13 sondas. La discrepancia con el presente estudio puede ser explicada por las diferencias de genotipos, número y tipo de CES y condiciones

de migración entre ambos trabajos.<sup>6,30</sup> Los estimados de distancia DB<sub>1</sub> y DB<sub>2</sub> estuvieron altamente correlacionados (r<sub>s</sub>=0.83), lo cual sugiere que es recomendable el uso de una sonda con una enzima de restricción, lo cual corrobora los reportes mencionados anteriormente.<sup>26-30</sup>

**Tabla 6.** Doce CES seleccionadas para estimar las distancias genéticas DB<sub>2</sub> y DP<sub>2</sub>.

Combinación Enzima/Sonda	Número medio de bandas / genotipo	Bandas Polimórficas	Patrones	
			totales	únicos
BNL8.39-BamHI	3.91	5	11	5
SSCIR60-Hind III	4.42	7	24	13
SSCIR69-XhoI	3.09	4	9	1
SSCIR73-Hind III	5.44	11	34	27
SSCIR76-HindIII	3.82	8	20	10
SSCIR92-Xho I	2.24	9	19	11
SSCIR107-EcoRI	3.00	9	21	11
SSCIR119-Hind III	4.00	7	23	12
SSCIR194-BamHI	5.69	11	26	19
SSCIR230-BamHI	4.60	8	32	23
UMC44-Hind III	3.84	9	17	12
UMC114-EcoRI	8.40	12	38	31
Promedio	4.36	8.3	22.8	14.5

El agrupamiento basado en los estimados  $DB_1$  y  $DB_2$  fue altamente coincidente (Fig. 2).



**Fig. 2.** Dendrogramas basados en los estimados de distancia  $DB_1$  y  $DB_2$ . A – F: agrupamiento de los genotipos. Las variedades cubanas están resaltadas.

El análisis de conglomerados basado en las bandas de las 35 CES permitió agrupar los 45 genotipos en 6 grupos (A – F). Los grupos A y C fueron altamente coincidentes de acuerdo a DB<sub>1</sub> y DB<sub>2</sub>. Estuvieron compuestos principalmente por variedades cubanas indicando una alta similitud molecular entre ellas. La distancia promedio dentro de estos grupos fue de 0.30 en ambos casos, lo cual confirma su agrupamiento, al ser menor que la distancia considerando todos los genotipos (0.34). El grupo A está integrado por 19 variedades y sólo dos no son cubanas, la B 42-231 y la Co 281, mientras que en el grupo C de cinco variedades sólo una no es cubana, la Co 312. En el grupo B hay sólo dos variedades cubanas de las 12 que lo constituyen. Las variedades C 227-59 (33) y Ja 64-11 (37) del grupo D, estuvieron también localizadas en el mismo grupo en ambos análisis.

Seis genotipos (PSA 96, BH 10/12, POJ 2878, POJ 2725, B 37161 y B 4362) del grupo B y otros dos genotipos (PR 980 y Q 33) del grupo B tuvieron una distribución cercana en ambos dendogramas.

Obsérvese que los somaclones quedan incluidos dentro del mismo grupo del donante (A). La distancia promedio (DB<sub>1</sub>) tomando en cuenta sólo los somaclones y la variedad donante fue de 0.25 mientras que con el resto de la población, la distancia promedio fue de 0.34. Estos resultados eran de esperarse ya que la variación somaclonal introduce pocos cambios en el genoma, a diferencia de los cruces sexuales donde ocurre recombinación de los genomas parentales, acrecentada en la caña de azúcar por ser esta altamente heterocigótica y poliploide.

## CONCLUSIONES

Los 45 genotipos de caña de azúcar caracterizados mediante RFLP, mostraron un alto nivel de polimorfismo, confirmando la utilidad de esta técnica para estos fines.

La presencia de variantes parcialmente correlacionadas entre diferentes CES revelados por una misma sonda no influye significativamente

en la determinación de los genofondos en los materiales estudiados al existir una alta correlación entre ambos estimados.

Las combinaciones EcoR I-UMC 114 y Hind III-SSCIR 73 permitieron la identificación precisa de 43 de los 45 genotipos.

Los híbridos comerciales estudiados se agruparon en seis genofondos (A – F), según la diversidad molecular revelada mediante RFLP. La presencia de las variedades cubanas en los genofondos A y C fundamentalmente, evidenció su alta similitud genética.

## BIBLIOGRAFIA

- Berding N. and Roach B.T. Germplasm collection, maintenance and use. In D.J Heinz ed. Sugarcane Improvement Through Breeding. Elsevier, Amsterdam, 140-185, 1987.
- Deren C.W. Genetic base of U.S. mainland sugarcane. **Crop Sci**, **35**, 1195, 1995.
- Rao P.S. Progress with the use of wild germplasm in the west Indies sugarcane breeding and evaluation network. ISSCT breeding workshop "Germplasm preservation - accomplishments and prospects", Montpellier, France, 1994.
- Lu Y.H., D'Hont A., Walker D.I.T., Rao P.S., Feldmann P. and Glaszmann J.C. Relationship among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica**, **78**, 7, 1994.
- Harvey M. and Botha F.C. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. **Euphytica**, **89**, 257, 1996.
- Besse P., McIntyre C.L. and Berding N. Characterization of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (*Andropogoneae-Saccharinae*) using RFLP markers. **Euphytica**, **93**, 283, 1997.
- Coto O., Cornide M.T., Pérez G., Ramos M., Canales E., de Prada F. y col. Diversidad molecular de clones de *Saccharum* spp. de interés para

el mejoramiento cañero revelada mediante RFLP. **Rev. CENIC Cienc Biol**, **30**, 200, 1999.

- Al-Janabi S.M., Honeycutt R.J., McClelland M. and Sobral B.W.S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. **Genetics**, **134**, 1249, 1993.
- Da Silva J.A.G., Honeycutt R.J., Burnquist W.L., Al-Janabi S.M. and Sorrells M.E. *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic linkage map containing RFLP and PCR based markers. **Mol Breeding**, **1**, 165, 1995.
- Grivet L., D'Hont A., Rogues D., Feldmann P., Lanaud C. and Glaszmann J.C. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. **Genetics**, **3**, 987, 1996.
- Guimaraes C.T., Sills G.R. and Sobral B.W.S. Comparative mapping of *Andropogoneae: Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. **Proc Natl Acad Sci**, **94**, 14261, 1997.
- Ming R., Liu S.-C., Lin Y.-R., da Silva J., Wilson W., Braga D. et al. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, **150**, 1663, 1998.
- Ming R., Liu S.-C., Moore P.H., Irvine J.E. and Paterson A.H. QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. **Genome Res**, **11**, 2075, 2001.
- Ramos M., Maribona R.H., Ruiz A., Korneva S., Canales E., Dinkova T.D., Rizo D., Izquierdo F. and Coto O. Somaclonal variation as a source of eyespot disease resistance in sugarcane. **Plant Breeding**, **115**, 37, 1996.
- Hoisington D. Laboratory Protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory, Mexico D.F. 1992.
- Feinberg A.P. and Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to

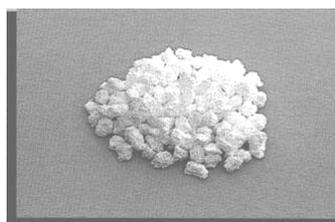
- high specific activity. **Anal Biochem**, **132**, 3, 1983.
17. Nei M. and Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc Natl Acad Sci**, **76**, 5269, 1979.
  18. MICROSTAT. Ecosoft, Inc. 1984.
  19. STATITCF. Versión 4.0. 1988.
  20. STATISTICA. Release 4.5, Stat Soft, Inc. 1994.
  21. Cornide M.T., Coto O., Canales E., Sigarrosa A., Sánchez J., Ramos M. y col. Desarrollo de las aplicaciones de los marcadores moleculares en el mejoramiento de la caña de azúcar en Cuba. Premio anual de la A.C.C., 1998.
  22. Sorrells M.E. Development and application of RFLPs in polyploids. **Crop Sci**, **32**, 1086, 1992.
  23. Wu K.K., Burnquist W., Sorrells M.E., Tew T.L., Moore P.H. and Tanksley S.D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single dose restriction fragments. **Theor. Appl. Genet.**, **83**, 294, 1992.
  24. Van Deynze A.E., Nelson J.C., O'Donoghue L.S., Ahn S.N., Siripoonwiwat W., Harrington S.E. et. al. Comparative mapping in grasses. Oat relationships. **Mol Gen Genet**, **249**, 349, 1995.
  25. Song K., Osborn T.C. and Williams P.H. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLP). 3. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (*syn. campestris*). **Theor Appl Genet**, **79**, 497, 1990.
  26. Figdore S.S., Kennard W.C., Song K.M., Slocum M.K. and Osborn T.C. Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in *Brassica*. **Theor Appl Genet**, **75**, 833, 1988.
  27. Helentjaris T., King G., Slocum M., Siedenstrang C. and Wegman S. Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. **Plant Mol Biol**, **5**, 109, 1985.
  28. Zhang Q., Zhou Z.Q., Yang G.P., Xu C.G., Liu K.D. and Saghai Maroof M.A. Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. **Theor Appl Genet**, **93**, 1218, 1996.
  29. Saghai Maroof M.A., Yang G.P., Zhang Q. and Gravois K.A. Correlation between molecular marker distance and hybrid performance in U.S. southern long grain rice. **Crop Sci**, **37**, 145, 1997.
  30. Lu Y.H., D'Hont A., Paulet F., Grivet L., Arnaud M. and Glaszmann J.C. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. **Euphytica**, **78**, 217, 1994b.
  31. Messmer M.M., Melchinger A.E., Boppenmaier J., Brunklaus-Jung E. and Herrmann R.G. Relationships among early European maize inbreds: I. Genetic diversity among flint and dent lines revealed by RFLPs. **Crop Sci**, **32**, 1301, 1992.

---

La Hidroxiapatita Porosa  **Coralina HAP-200** es un biomaterial para implantes óseos desarrollado por el Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba.

Se emplea para la reconstrucción de tejido óseo dañado o perdido, alcanzándose un éxito notable en especialidades tales como **odontología, cirugía maxilofacial, ortopedia y traumatología.**

## Formas de presentación



**GRANULADOS**



**BLOQUES  
RECTANGULARES**



**BLOQUES  
CIRCULARES**



**ESFERAS**  
(Implantes oculares)