

Los marcadores moleculares TRAP permiten identificar líneas transgénicas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) genéticamente similares al genotipo sin transformar

M. Francisca Perera*, S. Natalia Ovejero*, Josefina Racedo, Aldo S. Noguera*, María Inés Cuenya** y Atilio P. Castagnaro*

RESUMEN

Los marcadores moleculares son útiles para determinar la presencia de cambios genéticos durante el proceso de transformación. Entre ellos, los marcadores funcionales distribuidos al azar en todo el genoma pueden reflejar variaciones genéticas de interés directo. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue determinar la similitud con la variedad de caña de azúcar sin transformar de diferentes eventos transgénicos mediante el uso de marcadores TRAP ("Target Region Amplified Polymorphism"). Para ello, ADNs provenientes de los eventos transgénicos, los genotipos sin transformar y de otras variedades de caña de azúcar se caracterizaron mediante amplificación con siete a nueve combinaciones de cebadores TRAP. Los marcadores se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en el equipo Li-cor DNA Analyzer. Los fragmentos amplificados fueron transformados en matrices binarias de 0/1, utilizadas para calcular el coeficiente de Jaccard y construir árboles de similitud. En primer lugar, los marcadores permitieron confirmar las evaluaciones fenotípicas preliminares de eventos resistentes al herbicida glifosato de la variedad RA 87-3, dado que aquellos eventos fenotípicamente similares a la variedad sin transformar no mostraron cambios genéticos o solo algunos menores, mientras que eventos con aberraciones de crecimiento presentaron un alto nivel de polimorfismo. La incorporación en el análisis de otros genotipos permitió validar internamente la técnica asegurando el análisis de un número significativo de bandas polimórficas. Considerando la precisión de esta metodología, se la aplicó de rutina para caracterizar eventos transgénicos de las variedades LCP 85-384, TUCCP 77-42, TUC 95-10 y TUC 03-12 en las primeras etapas del proceso de evaluación. En conclusión, el uso de marcadores TRAP constituye una estrategia rápida y recomendable para caracterizar e identificar eventos transgénicos genéticamente próximos a su genotipo sin transformar. Esto posibilita la selección en las primeras etapas de evaluación de aquellos eventos más adecuados para realizar los ensayos a campo.

Palabras clave: marcadores moleculares, variación somaclonal, transgénesis.

ABSTRACT

TRAP markers allow the identification of sugarcane transgenic lines that are genetically close to their parental genotype

Molecular markers could be useful to determine the occurrence of genetic changes during the genetic transformation process. Among them, functional markers randomly distributed throughout the genome may reflect genetic variations of direct interest. For this reason, the objective of this work was to determine similarity to parental genotype of sugarcane of different transgenic events by using Target Region Amplified Polymorphism (TRAP) markers. DNAs from transgenic events, wild type genotypes and other sugarcane varieties were characterized by seven to nine combinations of TRAP primers. Molecular markers were separated by electrophoresis on polyacrylamide denaturing gels in a DNA Analyzer (Li-cor). Amplified fragments were transformed into either a 0/1 matrix. Similarity was calculated by using Jaccard coefficient and dendrograms were generated. At first instance, markers confirmed the preliminary phenotypic evaluations of herbicide resistant events of RA 87-3 variety since transformed events with close growth resemblance to its parental variety exhibited none or only minor genetic changes whereas events with growth aberrations showed a significant degree of polymorphism. The incorporation of other genotypes allowed validating the technique assuring that a significant number of polymorphic bands were analyzed. Considering the accuracy of the methodology, it was routinely applied to characterize transgenic events of LCP 85-384, TUCCP 77-42, TUC 95-10 and TUC 03-12 at early stages of the process. In conclusion, the use of TRAP markers is a quick and recommendable strategy to characterize and identify transgenic events genetically close to their parental genotypes. This makes possible the selection at the first stages of evaluation of those of the most valuable events to carry out field tests.

Key words: genetic transformation, molecular markers, somaclonal variation.

Fecha de recepción: 26/06/2019 - Fecha de aceptación: 02/12/2019

*Trabajo subsidiado por Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y proyecto PICTO 2016-0120 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. William Cross 3150, Las Talitas, Tucumán, R. Argentina, T4101XAC. franciscaperera@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo de extrema complejidad genética (Grivet *et al.*, 2001) por lo que el mejoramiento genético clásico resulta lento y laborioso. Por otro lado, en muchos de los casos en que los caracteres de interés agronómico no se encuentran en el germoplasma cultivado o en especies emparentadas, resulta prácticamente imposible la introgresión de los mismos mediante cruzamientos sexuales. En este sentido, una de las alternativas más valiosas al mejoramiento genético clásico en plantas es la transgénesis. Esta posibilita la incorporación de una o unas pocas características a un genotipo sobresaliente mediante la introducción e integración estable de un fragmento de ADN foráneo en el genoma de la célula vegetal (Caplan *et al.*, 1983). En el caso particular de la caña de azúcar, la transformación genética resulta una herramienta muy valiosa para superar las limitaciones asociadas con el mejoramiento convencional.

Entre los factores bióticos que afectan al cultivo de la caña de azúcar, las malezas generan importantes pérdidas de rendimiento debido a la competencia con el cultivo por agua, luz y nutrientes, además de ser albergue para plagas y patógenos. Para un control eficiente de las mismas es necesario el uso de herbicidas de alta efectividad, de amplio espectro y biodegradables, como el glifosato (Franz *et al.*, 1997). El uso de este herbicida total, que en contacto con el suelo se inactiva y degrada rápidamente, permite disminuir el número de aplicaciones. El empleo de glifosato resultaría sumamente ventajoso si se manejara adecuadamente, debido a que se utilizaría un único producto de bajo costo para el control de la totalidad de las malezas presentes. Este aspecto, que constituye una de las principales demandas del sector cañero, solo es posible mediante la introducción del gen CP4 *epsps* de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 (Padgett *et al.*, 1996), que otorga resistencia al glifosato en variedades comerciales de caña de azúcar de alto potencial productivo.

Uno de los aspectos negativos asociados a la transgénesis es la presencia de cambios genéticos (variación somaclonal) durante el proceso de transformación genética y regeneración *in vitro* (Gilbert *et al.*, 2009). Sin embargo, los estudios de caracterización genética mediante marcadores moleculares permiten determinar la presencia de este tipo de cambios durante todo el proceso y asegurar la similitud genética entre los eventos transformados y la variedad parental.

Entre los marcadores moleculares se encuentran los marcadores funcionales que distribuidos al azar en todo el genoma pueden reflejar variaciones genéticas de interés agronómico directo. Existen diferentes técnicas

de marcadores moleculares para detectar variaciones genéticas en regiones codificantes. Entre ellas, los marcadores TRAP ("Target Region Amplified Polymorphism") son marcadores basados en PCR, diseñados específicamente para detectar polimorfismos intragénicos. Estos marcadores se generan con un cebador sentido específico de aproximadamente 18 nucleótidos, diseñado a partir de un gen o EST ("Expressed Sequence Tag") y un cebador antisentido arbitrario del mismo tamaño aproximado, diseñado con un motivo AT o GC, de modo que hibriden con intrones y exones, respectivamente (Li and Quiros, 2001).

Considerando lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue identificar y predecir rápidamente la similitud con el genotipo parental de eventos transgénicos mediante el uso de marcadores TRAP detectados por el sistema semi-automatizado Li-cor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron mediante marcadores moleculares eventos transgénicos de caña de azúcar de las variedades RA 87-3, LCP 85-384, TUCCP 77-42, TUC 95-10 y TUC 03-12 y sus genotipos parentales. Se incluyeron varios genotipos como controles en cada ensayo para evaluar la precisión de la técnica, asegurando el análisis de un número significativo de bandas polimórficas: LCP 85-384, L 69-1002, RA 87-3, TUC 95-10, TUC 95-24, TUC 97-7, TUC 03-12 y TUCCP 77-42.

Extracción de ADN

El ADN total se extrajo utilizando un protocolo optimizado con CTAB (Aljanabi *et al.*, 1999) a partir de tejido "congelado a menos 60 grados" previamente, molido con nitrógeno líquido de todos los eventos transgénicos, los genotipos parentales y las otras variedades de caña de azúcar utilizadas como controles.

La concentración y la calidad de los ADN se determinaron midiendo la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro y mediante separación electroforética en geles de agarosa (0,7%) teñidos con GelRed (Biotium) y visualizados bajo luz UV, respectivamente.

Detección de eventos transgénicos

La presencia del gen CP4 *epsps* que otorga resistencia a glifosato se detectó mediante PCR usando los cebadores GLA-F (5'-GCAAATCCTCTGGCCTTCC-3') y GLA-R (5'-GCACGTTGAGGATGGTGAC-3'), mientras que el gen *nptII* que otorga resistencia a kanamicina/geneticina (agente de selección) se detectó con los cebadores NPTII-F (5'-ACTTGTCGACATGATTGAACAAGATGGATTG-3') y NPTII-R2 (5'-TTATAAGCTTGAAGAACTCGTCAAGAAG3-

'). Las condiciones de amplificación fueron: 30 ciclos a 95°C durante 30 s, 70°C (cebadores GLA) o 69°C (cebadores NPTII) durante 30 s y una extensión a 72°C durante 60 s. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) teñidos con GelRed (Biotium) y visualizados bajo luz UV.

Amplificación con marcadores TRAP

Las muestras de ADN de caña de azúcar se caracterizaron con seis a nueve combinaciones de cebadores TRAP. Los cebadores específicos (Alwala *et al.*, 2006) fueron diseñados a partir de genes asociados con el metabolismo de la sacarosa, mientras que los cebadores antisentido arbitrarios se obtuvieron de Li and Quiros (2001).

La mezcla de reacción, optimizada en nuestro laboratorio, contenía: 1x tampón para la Taq ADN polimerasa; 2,5 mM MgCl₂; 0,1 U Taq ADN polimerasa; 0,16 μM de ambos cebadores (Invitrogen, Life Technologies); 0,088 mM de cada dATP, dTTP y dGTP; 0,072 mM dCTP; 0,8 μM Cy5.5-dCTP (GE Healthcare Life Sciences) y 100 ng de ADN. Los parámetros de amplificación cuando se utilizaron los cebadores específicos SuSy 1, SuPS 2, PODK 3 y SAI 4 fueron los siguientes: un ciclo a 94°C durante 4 minutos; 35 ciclos a 94°C durante 45 s, 45°C durante 45 s y 72°C durante 1 minuto; y un ciclo a 72°C durante 7 min. Los parámetros de amplificación cuando se usaron los cebadores específicos SuPS 1, DirH, Sut 4 y Sut fueron los siguientes: un ciclo a 94°C durante 4 minutos; 5 ciclos a 94°C durante 45 s, 35°C durante 45 s y 72°C durante 1 minuto; 35 ciclos a 94°C durante 45 s, 50°C durante 45 s y 72°C durante 1 minuto y un ciclo a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en un equipo analizador de ADN (Li-cor). Los imágenes de los geles se analizaron utilizando el software SagaMX AFLP (Li-cor) y las bandas, evaluadas de manera dominante, se transformaron en una matriz binaria de 0 (ausencia) o 1 (presencia).

Análisis de datos

La similitud genética se calculó utilizando el coeficiente de Jaccard (Sj) (Sneath and Sokal, 1973a). Los análisis de conglomerados se realizaron utilizando el análisis de similitud de McQuitty (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973b). El módulo FIND se utilizó para identificar todos los árboles que fueron compilados por el módulo CONSEN para evaluar la robustez de la topología del árbol. Todos los cálculos se realizaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009).

RESULTADOS

Al amplificar por PCR el ADN de los posibles eventos transgénicos para los genes *epsps* y *nptII*, se detectaron diez eventos positivos de la variedad RA 87-3, cuatro de LCP 85-384, seis de TUCCP 77-42, 12 de TUC 95-10 y tres de TUC 03-12.

En primera instancia, los marcadores moleculares TRAP se emplearon para caracterizar los diez eventos transgénicos de la variedad RA 87-3. Estos eventos fueron previamente caracterizados a campo para evaluar su resistencia al glifosato y determinar el parecido fenotípico con su variedad parental, tanto propagada convencionalmente como obtenida por micropropagación *in vitro* en el marco del proyecto Vitroplantas de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). Entre ellos, seis eventos se mostraron fenotípicamente indistinguibles del genotipo sin transformar, por lo que se decidió evaluar mediante TRAP si este parecido fenotípico se correspondía con una elevada similitud genética. También se incluyeron tres variedades de caña de azúcar como controles: dos genotipos (TUC 95-24 y TUC 97-7) con un alto grado de similitud con RA 87-3, así como un genotipo genéticamente más distante (LCP 85-384), de acuerdo a resultados obtenidos en un estudio previo (Perera *et al.*, 2012). Se generó un total de 339 bandas no ambiguas, de las cuales el 36% resultaron polimórficas, con un promedio de 37 bandas por combinación de cebador (Tabla 1).

En el árbol de similitud obtenido (Figura 1), de los seis eventos con semejanza fenotípica con la variedad sin transformar, cinco (15, 18, 22, 28 y 37) no presentaron diferencias genéticas con la variedad RA 87-3. El evento restante (27) presentó dos bandas diferentes de las 277 que caracterizaron a la variedad (>99% de similitud), mientras que los cuatro eventos que exhibieron un fenotipo distinto de crecimiento mostraron un mayor grado de polimorfismo (92 - 95% de similitud) con la línea parental RA 87-3. Sin embargo, los diez eventos transgénicos evaluados mostraron una mayor similitud con RA 87-3 (>92%) en comparación con el 78% encontrado para las variedades genéticamente cercanas y el 68% para la variedad genéticamente distante de la colección de germoplasma de la EEAOC. Los perfiles de RA 87-3 propagada convencionalmente y micropropagada *in vitro* fueron iguales, por lo que ambos controles compartieron 100% de similitud.

Considerando los resultados obtenidos en la caracterización de eventos transgénicos de RA 87-3, donde se detectó una correlación clara entre parecido genético detectado por marcadores TRAP y el fenotípico, estos marcadores se utilizaron para caracterizar los

Tabla 1. Marcadores TRAP empleados para caracterizar eventos transgénicos de la variedad RA 87-3.

Cebador sentido específico	Cebador antisentido arbitrario	Fragmentos amplificados	Polimorfismo (%)
SuSy 1	Arbi 3	27	44,40
SuPS2	Arbi 1	34	35,29
	Arbi 2	44	29,54
PODK3	Arbi 1	34	23,53
	Arbi 2	36	22,22
	Arbi 3	43	60,46
SAI4	Arbi 1	47	59,57
	Arbi 2	40	17,50
	Arbi 3	34	38,23
Total		339	36,74

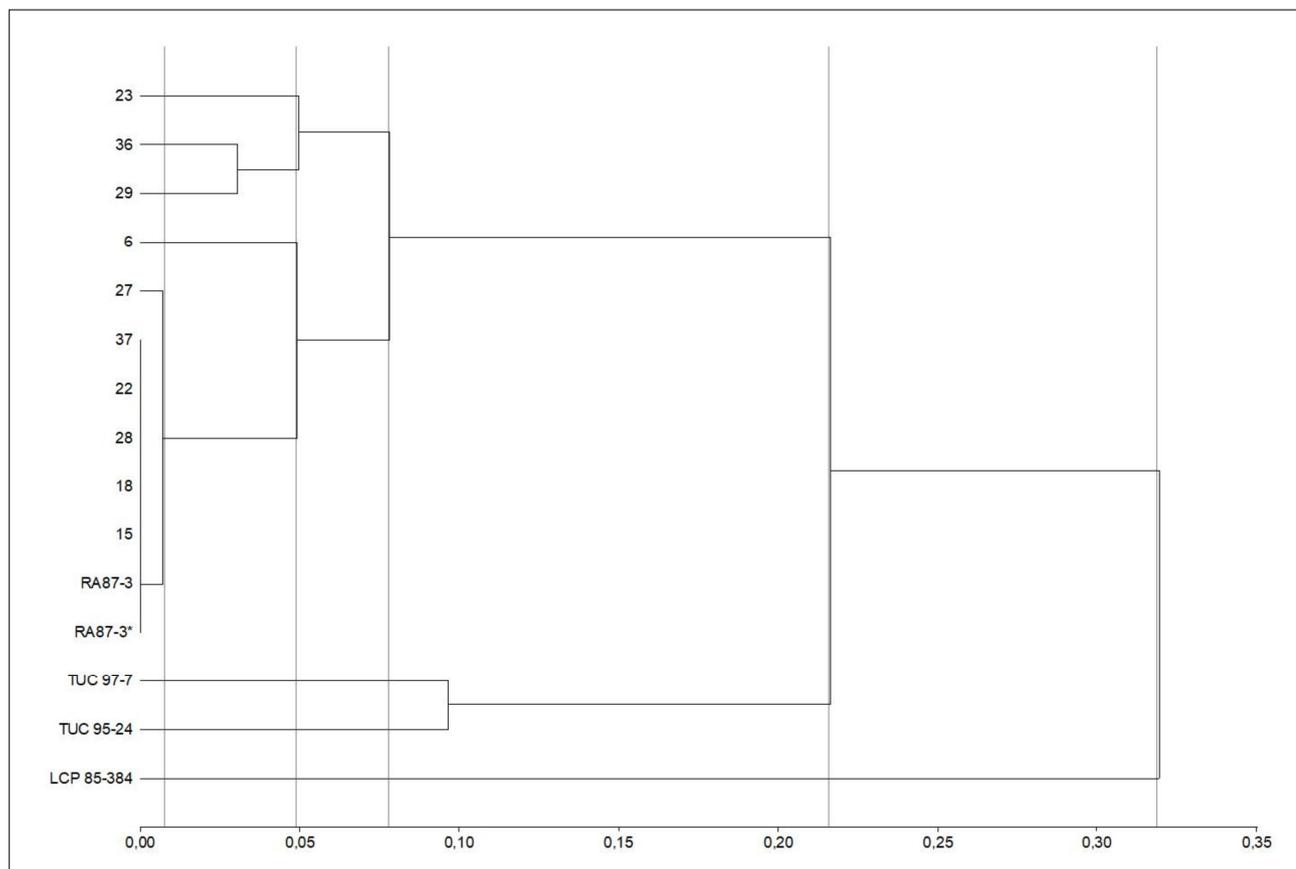


Figura 1. Dendrograma que representa las distancias genéticas entre cuatro variedades de caña de azúcar (LCP 85-384, RA 87-3, TUC 95-24 y TUC 97-7) y diez eventos transgénicos de la variedad RA 87-3, construido a partir del análisis de 339 marcadores TRAP. Las distancias se calcularon como 1-S (donde S es la similitud), utilizando el coeficiente de Jaccard y el método de agrupación UPGMA con el software InfoStat. *Control propagado *in vitro*. Líneas verticales: 0,0075 de distancia (99,25% de similitud), 0,05 de distancia (95% de similitud), 0,08 de distancia (92% de similitud), 0,22 (78% de similitud) y 0,32 (68% de similitud).

eventos transgénicos de las variedades LCP 85-384, TUCCP 77-42, TUC 95-10 y TUC 03-12, pero en las etapas iniciales del proceso.

Los eventos de las variedades LCP 85-384 y TUCCP 77-42 se caracterizaron en simultáneo con seis combinaciones de cebadores TRAP (Tabla 2). De los

Tabla 2. Marcadores TRAP empleados para caracterizar eventos transgénicos de las variedades LCP 85-384 y TUCCP 77-42.

Cebador sentido específico	Cebador antisentido arbitrario	Fragmentos amplificados	Polimorfismo (%)
SuPS1	Arbi 3	47	68,09
DirH	Arbi 1	37	62,16
	Arbi 2	62	41,94
	Arbi 3	35	100
Sut4	Arbi 2	57	96,49
Sut	Arbi 2	42	59,52
Total		280	71,36

cuatro eventos transgénicos de LCP 85-384, tres de ellos mostraron más del 92% de similitud y el otro solo el 78% de similitud con respecto a su variedad parental. En el caso de TUCCP 77-42, se caracterizaron seis eventos transgénicos y todos mostraron menos del 68% de similitud con respecto a su variedad parental.

Por otro lado, también se caracterizaron en simultáneo con siete combinaciones de cebadores TRAP los eventos transgénicos de las variedades TUC 95-10 y TUC 03-12 (Tabla 3). Respecto a TUC 95-10, se caracterizaron 12 eventos transgénicos, de los cuales cinco se obtuvieron mediante bombardeo de discos de hojas (embriogénesis directa) y mostraron más del 98% de similitud con su variedad parental. Sin embargo, los otros siete eventos transgénicos obtenidos por bombardeo de callos solo mostraron un 67% de similitud. Con respecto a los tres eventos transgénicos de TUC 03-12, mostraron más del 99% de similitud con respecto a la variedad no transformada.

En base a la experiencia previa y de acuerdo a los límites establecidos para asegurar la identidad genética de las líneas micropropagadas en el marco del Proyecto

Vitroplantas de la EEAOC, solo aquellos eventos transgénicos para las diferentes variedades con más del 95% de similitud con respecto a su variedad parental se evaluaron en condiciones de invernadero para determinar la resistencia al herbicida glifosato.

DISCUSIÓN

La caracterización genética mediante marcadores moleculares confirmó las evaluaciones fenotípicas preliminares, ya que los eventos transformados resistentes al herbicida glifosato de la variedad RA 87-3 con parecido fenotípico no mostraron cambios genéticos o solo algunos cambios menores, mientras que los cuatro eventos con aberraciones de crecimiento mostraron un grado significativo de polimorfismo. Además, la incorporación de otros genotipos como controles permitió evaluar internamente la precisión de la metodología empleada asegurando que se analizó un número significativo de bandas polimórficas.

Al caracterizar los eventos transgénicos de la variedad RA 87-3 se emplearon dos controles diferentes de

Tabla 3: Marcadores TRAP empleados para caracterizar eventos transgénicos de las variedades TUC 95-10 y TUC 03-12.

Cebador sentido específico	Cebador antisentido arbitrario	Fragmentos amplificados	Polimorfismo (%)
SuPS1	Arbi 3	36	25,00
DirH	Arbi 1	29	55,17
	Arbi 2	48	52,08
	Arbi 3	41	46,34
Sut4	Arbi 2	36	22,22
	Arbi 3	32	34,38
Sut	Arbi 2	31	32,26
Total		253	38,20

la variedad parental (propagado *in vitro* y convencionalmente). Los resultados corroboraron que no hay ningún efecto originado por el procedimiento de micropropagación *in vitro*, ya que no se detectaron diferencias en los perfiles de marcadores moleculares entre la planta propagada *in vitro* y la propagada en el campo de la variedad RA 87-3.

Por otro lado, para la obtención de caña de azúcar transgénica se utilizaron dos tipos de explantos, uno a partir de embriogénesis somática directa (ESD) y el otro de embriogénesis somática indirecta (ESI). En el último caso, la desdiferenciación celular para la formación de callos involucra un alto riesgo de variación somaclonal. El desarrollo de plantas transgénicas vigorosas con una variación somaclonal mínima depende de varios factores; entre ellos, la duración del cultivo de tejidos contribuye significativamente y es la más susceptible de modificación para minimizar los efectos no deseados (Taparia *et al.*, 2012). En ese sentido, la caracterización molecular de los eventos transgénicos de TUC 95-10 obtenidos por bombardeo de discos de hojas (ESD) y callos (ESI) reveló, como se esperaba, que los cambios genéticos inducidos por ESI son mayores que los producidos por ESD.

Los resultados obtenidos también revelaron que el uso de marcadores moleculares TRAP es una primera estrategia rápida y recomendable para seleccionar eventos transgénicos prometedores que se parezcan a su genotipo parental. Asimismo, parece ser una metodología más adecuada para detectar cambios genéticos ocurridos durante el proceso de transformación que otras técnicas de marcadores moleculares como RAPD (Taylor *et al.*, 1995) y AFLP (Joyce *et al.*, 2014), previamente utilizadas en caña de azúcar. Estas técnicas no pudieron detectar diferencias genéticas consistentes entre líneas fenotípicamente distintas. Merece destacarse también que con los marcadores TRAP se detectó un elevado polimorfismo en los eventos con fenotipo de crecimiento distinto de la variedad parental transformada. Los marcadores TRAP están orientados a loci específicos que no necesariamente están distribuidos en todo el genoma, por lo que se requieren estudios adicionales para explicar el polimorfismo detectado.

Cabe mencionar que después de obtener los resultados con los eventos transgénicos de la variedad RA 87-3, los marcadores TRAP se aplican de forma rutinaria para caracterizar todos los eventos transgénicos en la etapa de laboratorio antes de realizar cualquier prueba de concepto en invernadero. Se ha establecido que solo los eventos con más del 95% de similitud con respecto a su variedad parental se evalúan en condiciones de invernadero, de modo de adherirse al concepto que se aplica en seguridad alimentaria de equivalencia sustancial (OCDE, 1993). Este concepto establece que la seguridad de un nuevo alimento genéticamente modificado debe

determinarse por comparación con el alimento tradicional que ya se ha comprobado como seguro en un uso normal en el tiempo. En el caso de una planta transgénica de caña de azúcar se pretende que sea igual o equivalente a la variedad sin transformar cuya seguridad para el ambiente, la salud humana y animal ya ha sido comprobada y que la única diferencia sea la característica incorporada.

CONCLUSIONES

El uso de marcadores moleculares TRAP para caracterizar genéticamente los eventos transgénicos de caña de azúcar es un primer método rápido y recomendable para identificar plantas transformadas con similitud genética a su genotipo parental. Estos podrían aplicarse en las primeras etapas de selección de los eventos más adecuados para realizar pruebas de campo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aljanabi, S.; L. Forget and A. Dookun. 1999.** An improve and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol free sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol. Report.* 17: 281.
- Alwala, S.; A. Suman; J. A. Arro; J. C. Veremis and C. A. Kimbeng. 2006.** Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germoplasm collections. *Crop Sci.* 46: 448 - 455.
- Caplan, A.; L. Herrera-Estrella; D. Inze; E. Van Haute; M. Van Montagu; J. Schell and P. Zambryski. 1983.** Introduction of genetic material into plant cells. *Science* 222 (4625): 815 - 821.
- Di Rienzo, J.; F. Casanoves; M. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada and C. Robledo. 2009.** InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Franz, J. E.; M. K. Mao and J. A. Sikorski. 1997.** Glyphosate: A unique global herbicide. *American Chemical Society, Washington DC.*
- Gilbert, R.; N. Glynn; J. Comstock and M. Davis. 2009.** Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. *Field crops Res.* 111: 39 - 46.
- Grivet, L.; J. Glaszmann and P. Arruda. 2001.** Sequence polymorphism from EST data in sugarcane: a fine analysis of 6-phosphogluconate dehydrogenase genes. *Genetics and Molecular Biology* 24 (1-4): 161 - 167.
- Joyce, P.; S. Hermann; A. O'Connell; Q. Dinh; L. Shumbe and P. Lakshmanan. 2014.** Field performance of transgenic sugarcane produced using Agrobacterium and biolistics methods. *Plant Biotechnol. J.* 12: 411 - 424. doi:10.1111/pbi.12148

- Li, G. and C. F. Quiros. 2001.** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103 (2–3): 455 - 461.
- Padgett, S. R.; N. B. Taylor; D. L. Nida; M. R. Bailey; J. MacDonald; L. R. Holden and R. L. Fuchs. 1996.** The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of Conventional Soybeans. *J Nutr.* 126 (3): 702-716. DOI:10.1093/jn/126.3.702
- OCDE - Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos. 1993.** Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology: Concepts and principles. París, Francia.
- Perera, M.; M. Arias; D. Costilla; A. Luque; M. Garcia; C. D. Romero; J. Racedo; S. Ostengo; M. Filippone; M. Cuenya and A. P. Castagnaro. 2012.** Genetic diversity assessment and genotype identification in sugarcane based on DNA markers and morphological traits. *Euphytica* 185 (3): 491 – 510.
- Sneath, P. H. and R. R. Sokal. 1973a.** Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco.
- Sneath, P. H. and R. R. Sokal. 1973b.** Numerical taxonomy. *Theor. Appl. Genet.* 93: 613 – 617.
- Taparia, Y.; M. Gallo and F. Altpeter. 2012.** Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10.1007/s11240-012-0177.
- Taylor, P. W. J.; T. A. Fraser; Ko, H-L. and R. J. Henry. 1995.** RAPD analysis of sugarcane during tissue culture. En: Terzi, M.; Cella, R. and A. Falavigna (eds.), *Current issues in plant molecular and cellular biology.* Kluwer Academic Int., Dordrecht, pp. 241 - 246.