

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



Evaluación de la variación somaclonal en cinco variedades de *Musa* regeneradas *in vitro* utilizando marcadores RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA)

**Requisito previo a optar al título de:
Licenciatura en Biología**

Presentado por:

**Br. Norman Andrés Reyes Susano
Bra. Annie Jeans Ríos Narváez**

Tutor:

Dra. Verónica Díaz.

León, Nicaragua 2006

DEDICATORIA

Norman

A Dios: Por haberme regalado el don de la vida y por haberme permitido culminar mis estudios.

A mi madre:

Paula E. Susano Aburto, por siempre haber sido un pilar en mi vida, por haberme apoyado en la culminación de mis estudios y por ser un ejemplo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Norman

Al terminar este trabajo quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que colaboraron de diversas maneras e hicieron posible la culminación de mis estudios universitarios con este trabajo de investigación.

A **Annie Jeans Ríos Narváez**, mi mayor agradecimiento por haberme apoyado durante la realización de este estudio y durante toda la estadía en la universidad, así como por haber sido la persona que me dio fortalezas para poder terminar mis estudios, al mismo tiempo por darme su tiempo, compañía, respaldo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis tías **Norma, Nora y Nubia**, que me dieron su apoyo durante el desarrollo de mi carrera

A la **PhD. Verónica Díaz Vargas**, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Investigación, y por haberme brindado su tiempo en la resolución de los problemas que surgieron en la realización de este estudio.

Al programa de **Genética Molecular**, enmarcado en la cooperación del hermanamiento UNAN-LEÓN-UAH (Trieno 2003-2005), a través del cual tuvimos el respaldo necesario para realizar este trabajo investigativo.

A la **MSc. Lourdes Callejas Solórzano**, por estar siempre dispuesta a cooperar con los problemas surgidos en la realización de este estudio.

A **Aleyda Trujillo**, secretaria del Departamento de Biología por su amabilidad mostrada durante toda mi carrera.

A todos mis profesores del Departamento de Biología que siempre fueron pacientes, accesibles y excelentes maestros durante mi estadía en la Universidad.

DEDICATORIA

Annie

A Dios: Por haberme permitido la vida y haberme brindado salud, paciencia y el don de la sabiduría durante tantos años de estudio.

A mi adorada y querida Madre: Quien siempre me ha apoyado en los momentos más difíciles de mi vida brindándome su amor, cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Annie

A: Norman Andrés Reyes Susano, quien permaneció a mi lado durante mi estadía en la Universidad, brindándome su apoyo y comprensión en los momentos que más lo necesitaba.

A la Dra. Verónica Díaz: Por haberme brindado parte de sus conocimientos durante la realización de mis estudios universitarios, así como también le agradezco por haber dedicado parte de su preciado tiempo en la realización de este trabajo.

A la Srta. Aleyda Trujillo: Secretaria del Departamento de Biología, quien siempre mostró cordialidad, disponibilidad y atención.

Y a todas aquellas personas que hicieron posible este trabajo investigativo y que de una u otra forma me apoyaron en el transcurso y culminación de mi carrera como los son mis preciados profesores.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismo para la longitud de fragmentos amplificados
CTAB	Bromuro trimetil amonio de cetilo
dNTP	2'- deoxinucleósido 5' trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FHIA	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
INIBAP	Red Internacional Para el Mejoramiento de Plátanos y Bananos
M	Molar
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso Molecular
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	ADN Polimórfico Amplificado al Azar
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
Tris	2-amino-2 (hidroximetil)-1-1-3-propanodiol
U	Unidades de Enzima
UPGMA	Unweighted Pair Group Meted Average
UV	Ultravioleta
V	Voltio
VNTR	Número variable de las repeticiones en tandem
µl	microlitro
µg	microgramo

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	4
4. Marco Teórico	5
4. 1 Origen e importancia de las Musáceas	5
4. 2 Ecología	6
4. 3 Variedades de Musa encontradas en Nicaragua	6
4. 4 Descripción Fenológica	6
4. 5 Cultivo <i>in vitro</i> y aplicaciones.....	7
4. 6 Variación Somaclonal	8
4. 7 Factores que afectan la Variación Somaclonal.....	9
4. 8 Estructura del ADN	10
4. 9 Duplicación de ADN.....	11
4. 10 Extracción de ADN.....	12
4. 11 Generalidades de marcadores moleculares.....	14
4. 12 PCR	15
4. 13 Aplicaciones de PCR.....	16
4. 14 Parámetros que afectan la eficiencia de la PCR.....	17
4. 15 RAPD.....	17
4. 16. Usos de RAPDs en la detección de variación somaclonal.....	19
4. 17 Electroforesis	20
5. Metodología	23
5. 1 Obtención de la muestra	23
5. 2 Extracción de ADN	24
5. 3 Chequeo, Cuantificación y dilución de ADN	25
5. 4 Selección de cebadores	25
5. 5 Preparación de la mezcla de reacción	26
5. 6 Proceso de amplificación RAPD	27
5. 7 Chequeo de los fragmentos de amplificación.....	27
5.8 Análisis de datos	28
6. Resultados y Discusión.....	29
6. 1 ADN obtenido	29
6. 2 Patrones de bandas obtenidas con RAPD.....	29
6. 3 Nivel de polimorfismo encontrado en <i>Musa</i>	32
6. 4 Análisis del dendrograma.....	35
7. Conclusiones	38
8. Recomendaciones	39
9. Bibliografía	40
10. Anexos	44

I. RESUMEN

El presente trabajo consistió en determinar el grado de variación somaclonal en un total de 35 muestras de plántulas de cinco variedades de *Musa* regeneradas *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejido. El estudio de variación somaclonal se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología, utilizando la técnica RAPD, un marcador molecular basado en la PCR.

Se ensayaron 53 cebadores tomados al azar en 3 individuos de todas las variedades, de ellos se eligieron los mejores 11 que presentaron productos de amplificación reproducibles y que generaron un total de 68 bandas. Los cebadores que produjeron el mayor número de bandas fueron D-07, H-07, B-05 y N-09 con un total de 10, 8, 8 y 7 bandas respectivamente, teniendo los restantes cebadores un promedio de 5 bandas. Los cebadores que generaron mayor porcentaje de polimorfismo fueron N-09, A-04 y H-07, éste último generó patrones de bandas que permiten diferenciar molecularmente cada una de las variedades.

Todas las variedades analizadas en este estudio presentaron variación somaclonal. Las variedades que mostraron mayor variabilidad genética fueron FHIA-03 y FHIA-17 con un porcentaje de polimorfismo de 43.38 y 42.48 respectivamente; la variedad que mostró mayor estabilidad genética con estos cebadores fue FHIA-25 con un porcentaje de polimorfismo de 19.13. Con el programa NTSYS se obtuvo un dendrograma en el que se observan dos agrupamientos principales (con aproximadamente un 47% de similitud genética) reflejándose una estrecha relación genética entre los individuos dentro de cada variedad y las variedades tetraploides en general presentan mayor similitud entre sí que con la única variedad triploide, sin embargo, es obvio la presencia de variación somaclonal puesto que de las 35 muestras analizadas sólo dos individuos (5.71%) de la FHIA-25 presentan un 100% de similitud genética.

II. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos es una herramienta de gran utilidad en la biotecnología. Esta técnica se basa en la "totipotencialidad celular"; capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa bajo ciertas condiciones químicas y físicas, dadas en el cultivo *in vitro*. En general, en cultivo de tejidos se busca inducir embriogénesis somática, que es una eficiente forma de multiplicación clonal. La variabilidad genética inducida por condiciones *in vitro* es conocida como variación somaclonal (INIA, 2005).

Según Lindsey, (1989); la variación somaclonal es un fenómeno general en todos los sistemas de regeneración de plantas que incluyan una fase callosa, tanto si la regeneración ocurre a través de una embriogénesis somática o por formación de vástagos adventicios. Las variaciones producidas pueden darse por cambios en el número de cromosomas (poliploidías y aneuploidías), rompimientos de los cromosomas y fragmentación nuclear, mutaciones puntuales y cambios epigenéticos (Navarro, 1996). Estos cambios se pueden detectar a niveles fenotípicos, anatómicos o bioquímicos. Esta variación es a menudo heredable y por lo tanto indeseable en la propagación clonal (Larkin, 1984; citado por Goto y col. 1998). Sin embargo, constituye un método alternativo para crear nuevos genotipos de cultivos.

Con la introducción de los métodos de la Biología Molecular en los programas de mejora vegetal, la caracterización morfológica de germoplasma se vio fuertemente auxiliada con el uso de técnicas que evalúan la diversidad genética a nivel del genoma. Una de estas técnicas es el RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), la cual está basada en la amplificación al azar de diferentes fragmentos de DNA para identificar polimorfismos que son usados como marcadores (Williams y col, 1990). Esta técnica ha sido muy útil en la detección de variantes somaclonales en diferentes especies desde *Musa sp*, palma, ajo y centeno entre otras (Polanco y Ruiz 2002).

En 1997 se introdujeron en Nicaragua seis variedades de *Musa* que se reproducen *in-vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNAN-León, con los objetivos de propagar plantas que fuesen más resistentes a las plagas, a la sequía y que tuviesen por lo tanto un mejor rendimiento en la producción (UNAN-León, s.f.). En este Laboratorio anualmente se producen

50,000 mil plantas (UNAN-León, 2004) que luego de aclimatarse se destinan al cultivo comercial. Durante estos años no se ha reportado diferencias fenotípicas entre plantas dentro de estas variedades, pero dado el gran número de reportes de variación somaclonal en diversos cultivos tanto en *Musa* (Salazar y col., 2002), como en zanahoria (Pawlicki y col, 1993), papas (Potter y Jones, 1991), tomate (Compton y col.1991) entre otros, y puesto que la variación se reporta a diferentes niveles, se considera oportuno en este estudio utilizar la técnica RAPD que ha dado muy buenos resultados en la detección de variación somaclonal en *Musa*, con el fin de determinar el nivel de variación genotípica presente en cinco de las variedades introducidas y micropropagadas, puesto que al ser clones con propiedades agronómicas valiosas, es importante monitorear su identidad y su estabilidad genética durante el proceso de micropropagación (es decir en una etapa temprana del desarrollo de las plantas), considerando que los resultados que se generen permitirán conocer la calidad genotípica del material vegetal que se entrega al productor y monitorear en un futuro el comportamiento de las variedades utilizando para ello el cebador o los cebadores específicos que detecten polimorfismo en cada variedad, lo que implicaría la reducción del costo de estos análisis.

III. OBJETIVO GENERAL

Estimar el porcentaje de variación somaclonal dentro de variedades de *Musa* regeneradas *in vitro* por medio de la técnica RAPD.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la variedad o variedades que presentan mayor o menor incidencia de variación somaclonal.

Identificar al menos un cebador que permita diferenciar molecularmente a cada una de las diferentes variedades estudiadas.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Origen e importancia de las Musáceas

Según investigaciones realizadas se considera que las Musáceas son originarias de Asia y se expandieron a través del Pacífico en la prehistoria. Se han encontrado libros sagrados en donde se hace mención a ellas, así como en pinturas en los templos de la India, la que se ha descrito como uno de los grandes centros de hibridación de *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B) (Gower, 1995).

Las Musáceas llegan por primera vez al Sub-Sahara (África) poco tiempo después del nacimiento de Cristo, posteriormente se dispersan por el continente. El traslado de ellas a las Américas se debe al sacerdote Tomás de Berlanga quien las trae en 1516 desde Gran Canarias hasta Santo Domingo, también se cree que con la introducción de los esclavos estas plantas llegaron a Brasil (Gower, 1995).

El cultivo de plátanos y bananos es de vital importancia para cientos de millones de personas en los países en desarrollo y representa uno de los cultivos de frutas más importante en el mundo. Se considera que el 90% de la producción total es usada como alimento para consumo doméstico. Los bananos principalmente son cultivos intensivos para exportar a Europa y Norteamérica donde se utilizan como postres. Mientras que los plátanos y guineos se cultivan a menudo a pequeña escala en parcelas para consumo local, (Vidal y García, 2000; Fauré y col.; 1993). Estos cultivos sin embargo son también susceptibles a un amplio rango de patógenos de plantas incluyendo hongos, bacterias, virus y nemátodos lo que limita su eficiencia productiva. (Vidal y García, 2000). Por ello se ha hecho urgente desarrollar cultivares que sean resistentes a enfermedades tales como el Mal de Panamá (causada por *Fusarium oxysporum f cubense*) que destruyó la mayoría de las plantaciones de Centro América y el Caribe entre 1910 y 1955, a la Sigatoka (causada por *Mycosphaerella musicola*) o la quemadura de la hoja (causada por *Mycosphaerella fijiensis*), entre otras (Fauré y col.; 1993).

4.2 Ecología

Para todo cultivo son relevantes tanto los factores ecológicos como los fitosanitarios. Las Musáceas se desarrollan en zonas tropicales húmedas y cálidas, donde se encuentra el clima apropiado para tener un crecimiento continuo. La temperatura es muy importante en el desarrollo de la planta, ésta requiere temperaturas relativamente altas que varían entre 21-29.5 °C con una media de 27 °C, su mínima es de 15.6 °C. Pueden ser afectadas por el viento ya que les ocasiona deformaciones en las hojas reduciendo la producción, así como también la caída de las plantas por desraízamiento, esto sucede con vientos que sobrepasan los 55 Km/h. También la luz solar es importante, especialmente la comprendida entre 0.4-0.7µm del espectro, el no recibir lo necesario puede afectar la fotosíntesis de las hojas y el desarrollo del fruto (Soto, 1995).

Estas plantas por su estructura botánica requieren de una gran disponibilidad de humedad permanente en los suelos siendo valores óptimos 6.28mm/día que es equivalente a 6.28 L/m²/día (Soto, 1995).

4.3 Variedades encontradas en Nicaragua

Se encuentran diferentes variedades y/o clones de Musáceas en Nicaragua (Ver Anexos tabla 1), son materiales criollos llamados comúnmente guineos, plátanos y bananos; en esta identificación se tomó en consideración la forma del fruto, en el guineo los frutos tienen cuatro aristas bien marcadas por lo cual son llamados guineos cuadrados, los plátanos son frutos más largos con tres aristas y los bananos son angulosos cuando son jóvenes y llegan a ser cilíndricos por la acumulación del almidón.

4.4 Descripción Fenológica de las variedades analizadas en este estudio

Las cinco variedades FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola) utilizadas en este estudio cuentan con las siguientes características fenológicas (UNAN-León, s.f.).

Tabla 2. Características Fenológicas de las cinco variedades FHIA analizadas en este estudio.

Variedad	Altura (m)	Tiempo De 1 ^{era} Cosecha (meses)	Manos por Racimo	No de frutos por Mano	Importancia Agronómica	
FHIA-01	2.5	13-14	8-11	130-160 Bananos	Muy Resistente	Sigatoka Negra y Mal de Panamá
					Resistente	Nemátodos y Picudos
FHIA-03	2-3	12-14	9-10	140-160 Guineo	Muy Resistente	Sigatoka Negra y Moko
					Resistente	Nemátodos, Picudo Negro y Mal de Panamá
FHIA-17	3.5-4.5	15-17	10-12	200-250 Bananos	Resistente	Nemátodos, Picudo Negro y Mal de Panamá
					Tolerante	Sigatoka Negra
FHIA-20	3	12-15	8-10	120-160 Plátanos	Resistente	Sigatoka Negra y Mal de Panamá
FHIA-25	2.5-3.5	11-13	14-17	250-330 Bananos	Muy Resistente	Sigatoka Negra
					Resistente	Picudo Negro, Mal de Panamá y Nemátodos

4.5 Cultivo *in vitro* y sus aplicaciones

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* según Navarro (1996), consiste en cultivar pequeños segmentos de la planta (explantes) sobre medios sintéticos y en condiciones controladas con el propósito de regenerar plantas enteras. Se pueden regenerar plantas a partir de cualquier parte de la planta: meristemas, yemas axilares, embriones, cotiledón, hipocótilo, tallo, hojas, raíz, inflorescencias, pétalos, óvulos, polen. Es necesario recalcar que las condiciones de asepsia deben de mantenerse a lo largo de todas las etapas del proceso del cultivo *in vitro*. Así se obtiene la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original a partir de cualquier parte aislada de la planta, sean estos trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. Inicialmente se usó esta técnica para la multiplicación masiva de plantas élites o micropropagación y también en la obtención de clones libres de virus (INIA, 2005).

Con esta técnica se han multiplicado distintas variedades de arándanos, frutillas, papas, camotes, ajos, especies medicinales y aromáticas (lavandines). Asimismo, se ha trabajado en la limpieza de virus que afectan algunas especies vegetales (por ejemplo virus endémicos que atacan a cultivares de ajo). Actualmente, el cultivo *in vitro* es empleado ya sea en la fusión de protoplastos (células vegetales carentes de pared celular, producidos por degradación enzimática) para obtener híbridos que no se conseguirían por métodos tradicionales, aunque no es viable la fusión de protoplastos entre especies muy alejadas filogenéticamente entre sí (Balbás, 2002), o en el cultivo de anteras para obtener haploides en el desarrollo de líneas puras. Otro uso alternativo del cultivo de tejidos ha sido el rescate de embriones inmaduros que permite combinar variabilidad o crearla en el caso de no existir, rompiendo barreras naturales entre especies y favoreciendo el flujo de genes entre ellas o entre variedades (INIA, 2005).

4. 6 Variación Somaclonal

La variabilidad genética inducida por condiciones *in vitro* es conocida como variación somaclonal y no está limitada a ningún grupo particular de plantas (Larkin y Scowcroft, 1981; Polanco y Ruiz, 2002). La variación somaclonal tiene particular interés como fuente de nuevos genotipos agrónomicamente útiles para el uso potencial en mejora genética, sin embargo, si el principal objetivo es la transformación genética (en la que por lo general se busca alterar sólo un carácter) o la propagación clonal (con la que se pretende obtener réplicas idénticas o clones), este fenómeno se vuelve indeseable. Las revisiones sobre variación somaclonal aparecieron especialmente durante los años ochentas cuando la aplicación de las técnicas de cultivo de tejido se expandieron e incluyó un amplio rango de especies previamente recalcitrantes (Veilleux y Johnson, 1998).

Según Lindsey (1989), la variación somaclonal es un fenómeno general en todos los sistemas de regeneración de plantas que incluyan una fase callosa, tanto si la regeneración ocurre a través de una embriogénesis somática o por formación de vástagos adventicios. Este fenómeno abarca a plantas regeneradas a partir de protoplastos, explantes cultivados (embriones inmaduros, inflorescencias, hojas, tallos, tubérculos, etc.), microesporas, anteras, ovarios y también plantas regeneradas a partir de tejidos tumorales cultivados.

Uno de los primeros trabajos sobre la variación somaclonal utilizó como material plantas de caña de azúcar regeneradas a partir de cultivos somáticos. Entre las plantas regeneradas eran patentes los cambios en la morfología, tales como la longitud de la aurícula y la presencia o ausencia de pelos. También se ha estudiado en patata, donde se ha descrito variación en algunos caracteres de interés agronómico. La variación somaclonal se ha descrito también en cereales, como el trigo, maíz, avena y arroz, y en dicotiledóneas como el tabaco, tomate, zanahoria y apio (Lindsey. K, 1989).

Debido a que altos niveles de variación somaclonal se han reportado en plantas generadas por raíces adventicias o por la formación de embriones somáticos, en particular después de una fase intermedia callosa es importante conocer la frecuencia, los mecanismos y los factores que influyen sobre la variación somaclonal (Polanco y Ruiz, 2002; Veilleux y Johnson, 1998).

4.7 Factores que afectan la variación somaclonal

Veilleux y Johnson (1998), proponen los siguientes mecanismos y tipos de variación somaclonal:

Mecanismos:

1. Variación preexistente en el explante usado para iniciar el cultivo (ej: mutaciones somáticas, grado de metilación del ADN y endopoliploidización).
2. Tipo de cultivo (ejemplo: cultivos de callos caracterizados por una gran desdiferenciación inducida por altas concentraciones de reguladores de crecimiento, en contraste a la regeneración de raíces de meristemas preexistentes).
3. Edad del cultivo. Generalmente se ha encontrado más variación entre plantas regeneradas de viejos cultivos.

4. Genotipo de la planta fuente. Algunos genotipos parecen ser más propensos a la variación somaclonal que otros aún dentro de la misma especie
5. Precombinación mitótica. Proceso por el cual se pueden regenerar plantas homocigotas en un locus que se consideraba heterocigota.

En los tipos de variación somaclonal se incluyen:

1. Aberraciones cromosómicas, incluyendo número o estructura de cromosomas, por ejemplo poliploidía, aneuploidía, translocaciones.
2. Activación de elementos transponibles, son secuencias de ADN que se transponen de un sitio a otro en el genoma, como por ejemplo la familia de genes de la hemoglobina humana que se encuentran dispersa en los cromosomas.
3. Variación epigenética, como por ejemplo cambios en la metilación del ADN, la cual ha sido generalmente asociada con la disminución de la expresión génica en eucariotas. Los cambios epigenéticos no se heredan sino que se producen durante el desarrollo (Puertas, 1999).
4. Mutaciones puntuales que son cambios que ocurren en puntos específicos del ADN como por ejemplo la sustitución de una o unas pocas bases nucleotídicas por otras (Fontdevila y Moya, 1999).

4.8 Estructura del ADN

En la actualidad, se sabe que el ADN (Ácido Desoxirribonucleico); es la molécula encargada de transmitir la herencia, ya que los genes están formados por ADN, en el que cada elemento de construcción del ADN es un nucleótido, formado de un azúcar pentosa (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (Solomon y col., 1998). Por ello, el ADN puede considerarse como un polímero formado por 4 clases de monómeros que son moléculas de desoxirribosa fosforiladas con bases purínicas o pirimidínicas unidas a su carbono

1'. En las purinas (adenina y guanina), la unión se realiza en el nitrógeno 9 y en las pirimidinas (citosina y timina), la unión se da en el nitrógeno 1. Estos monómeros son los que se denominan nucleótidos (Mathews y VanHolde, 1998).

Las bases nitrogenadas están unidas al carbono 1' del azúcar y el fosfato lo está al carbono 5', de este modo se forman polímeros con longitud indefinida. Los nucleótidos están unidos entre sí por enlaces covalentes del carbono 3' de un azúcar al fosfato 5' del azúcar adyacente, formando así un enlace fosfodiéster 3' a 5'. La doble cadena se mantiene unida por puentes de hidrógeno que se forma entre la adenina y la timina (A=T), y entre la guanina y la citosina (G≡C), lo que se conoce como apareamiento de bases específicas. Por lo tanto la secuencia de bases en las dos cadenas son complementarias, pero no idénticas entre sí y constituyen el medio para almacenar la información genética (Solomon y col., 1998).

4.9 Duplicación del ADN

Los principios generales de la replicación del ADN son predicciones sencillas y directas a partir del modelo de Watson y Crick, con dicho modelo se hizo más evidente el hecho de que el ADN es el material genético y que puede contener información codificada en su secuencia de bases (Solomon y col., 1998).

Aunque el principio en el que se basa la replicación génica es elegante y simple, la maquinaria real con la que se realiza esta copia en la célula es complicada y está compuesta por un complejo de proteínas que forman una máquina de replicación. La enzima *ADN polimerasa* cataliza la adición de un desoxirribonucleótido al extremo 3' de una cadena de ADN. Cada nucleótido añadido a la cadena es, en realidad un desoxirribonucleósido trifosfato, la liberación del pirofosfato de este nucleótido activado y su hidrólisis posterior proporcionan la energía necesaria para la reacción de replicación del ADN (Alberts y col., 1996).

La replicación del DNA comienza en una secuencia de nucleótidos particular en el cromosoma: el origen de la replicación. Ocurre bidireccionalmente por medio de dos horquillas

de replicación que se mueven en direcciones opuestas. Las enzimas helicasas desenrollan la doble hélice en cada horquilla de replicación y proteínas de unión a cadena simple (SBS) estabilizan las cadenas separadas. Otras enzimas, las topoisomerasas, relajan el superenrollamiento de la hélice, ya que cortan las cadenas por delante de las horquillas de replicación y luego las vuelven a unir. Para que pueda comenzar la replicación se necesita una corta secuencia de cebador de RNA, con sus bases correctamente apareadas con la cadena molde. La adición de nucleótidos de DNA a la cadena es catalizada por las DNA polimerasas. Estas enzimas sintetizan nuevas cadenas sólo en la dirección 5' a 3', añadiendo nucleótidos uno a uno al extremo 3' de la cadena creciente (Curtis, 2000).

La replicación de la cadena adelantada es continua, pero la replicación de la cadena rezagada es discontinua. En la cadena rezagada, fragmentos de Okazaki se sintetizan en la dirección 5' a 3'. La enzima DNA ligasa une fragmentos de Okazaki contiguos. En el proceso de replicación del DNA se pierden nucleótidos en los extremos de las moléculas de DNA lineales. En algunas células eucarióticas, esta pérdida es compensada por la actividad de la enzima telomerasa. En el curso de la síntesis de DNA, la DNA polimerasa corrige los errores, retrocediendo cuando es necesario para eliminar nucleótidos que no estén correctamente apareados con la cadena molde. Otros errores en el DNA ocurren en forma independiente del proceso de replicación y son usualmente reparados por distintos mecanismos (Curtis, 2000).

4.10 Extracción de ADN (Hoelzel, 1998)

La mayor parte de los estudios poblacionales de ADN están basados en la extracción de ADN seguido por la selección de subgrupos del genoma (organelar o nuclear) y su análisis por PCR, Shouthern Blotting o clonación.

Dependiendo del estudio a realizar en la muestra de ADN, la extracción total de ADN puede ser fácilmente adaptada a la disponibilidad de las muestras del tejido. Por ejemplo, al ser la PCR muy sensitiva y requerir de pequeñas cantidades iniciales del ADN molde, es suficiente aislar muy poca cantidad de ADN. Por el contrario, en técnicas basadas en Shouthern Blotting

como es el caso de los RFLPs, generalmente se requieren cantidades más grandes e intactas de ADN.

En los laboratorios a menudo se modifican los pasos en el procedimiento de los protocolos de extracción existentes, en dependencia de la especie a analizar, sin embargo todos siguen las siguientes líneas generales: rompimiento del tejido, solubilización de los componentes celulares, seguido de la separación y purificación del ADN de los complejos celulares.

Los tampones utilizados para la extracción de ADN de origen animal típicamente contienen un tampón (casi universalmente TRIS) para mantener el pH, EDTA como agente quelante se utiliza para eliminar los cationes divalentes como el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) y en consecuencia inhibir las ADNasas, una sal de sodio (Na) o potasio (K) para estabilizar los ácidos nucleicos en un medio isotónico y una proteasa (usualmente la proteínasa K) para digerir las proteínas, un detergente aniónico (usualmente, SDS) es a menudo incluido para solubilizar las membranas celulares y desnaturalizar proteínas.

Al contrario de las células animales, las células de plantas comúnmente contienen numerosos componentes secundarios, la composición varía grandemente de especie a especie, por ello se han desarrollado muchas alternativas para superar los problemas encontradas en especies en particular, una notable diferencia es que en algunos casos el detergente catiónico CTAB es comúnmente utilizado en lugar del SDS.

El pH del tampón y la concentración de cada componente pueden variar en dependencia del tipo de tejido, por ejemplo altas concentraciones de EDTA (mayores de 500 mM) son usadas para desmineralizar tejidos de huesos durante la extracción.

Debido a que los componentes de los tampones de extracción pueden ser modificados en diferentes formas, desafortunadamente cuando enfrentamos problemas de contaminación, degradación o baja producción es difícil asegurar cual es la causa. Tanto el pH del tampón de extracción como los agentes protectores específicos o los detergentes incluidos necesitan ser optimizados para especies particulares. El pH debería ser seleccionado para evitar las enzimas degradativas, por ejemplo enzimas lipolíticas y lipoxigenasa tienen un pH óptimo entre 6 y 7 mientras que las ADNasas nucleares tienen un pH óptimo de aproximadamente 7. Como resultado muchos tampones de extracción para ADN de plantas tienen un pH de 8 como mínimo

y 9 como máximo. El β -mercaptoetanol, cisteína y otros tioles son comúnmente incluidos para proteger al ADN de las quinonas, peroxidadas y polifenoloxidasas. El PVP es agregado para disminuir el efecto de los polifenoles, quinonas y taninos.

4.11 Generalidades de Marcadores Moleculares

Desde sus comienzos, el objetivo del mejoramiento vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir del reconocimiento de fenotipos superiores. Numerosos progresos se han realizado a través de la mejora de plantas desarrollando germoplasmas con tolerancia al estrés biótico o abiótico; superior calidad y adaptación a diferentes condiciones de crecimiento y sistema de producción (Martínez y Thome, 2001).

El grado del éxito en estos procesos depende del control genético de la característica, es decir del número de genes que la codifican y controlan (herencia monogénica o poligénica) y las relaciones interalélicas (dominancia o aditividad); además del grado de influencia ambiental que se mide normalmente a través del parámetro de heredabilidad. Una serie de técnicas moleculares de gran desarrollo en los últimos veinte años permiten conocer la información genética que los organismos portan. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y se los conoce en forma genérica como marcadores moleculares (Gupta, y col.; 1999).

Los marcadores moleculares basados en el ADN tienen una serie de ventajas sobre los marcadores morfológicos (fenotípicos) y las proteínas que fueron los primeros marcadores disponibles para los mejoradores de plantas. Los marcadores basados en el ADN tienen gran alcance para mejorar la eficiencia de la mejora de plantas al detectar marcadores ligados a un carácter de interés. Además no están influenciados por el medio ambiente, no son afectados por las condiciones del crecimiento y son detectables en todos los estados del desarrollo de la planta (Martínez y Thome, 2001)

Los marcadores moleculares son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana. Permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN

entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo como por ejemplo RAPD, RFLP y AFLP. En relación a los vegetales son de utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, protección legal de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores y clonado de genes (Ferreira, y Grattapaglia, 1996).

Según Roca y Ramírez (1999); los marcadores como RFLP e Isoenzimas permiten diferenciar un individuo homocigoto de un heterocigoto debido a que son codominantes. Este marcador así como AFLPs y RAPDs, suelen estar distribuidos por todo el genoma. Por otro lado los marcadores RAPDs y AFLPs poseen la ventaja de ser rápidos y de fácil ejecución debido a que son automatizados (basados en la PCR). A diferencia de los RAPDs los marcadores RFLPs y AFLPs poseen la propiedad de tener una alta reproducibilidad aún entre laboratorios. Los VNTR (microsatélites) son ideales para tipificar individuos por lo que son muy útiles en medicina legal y forense.

4.12 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Según Dieffenbach y Dvesksler (1995), la PCR es una técnica que permite duplicar un número ilimitado de veces fragmentos de ADN en un tubo de ensayo. Mediante esta técnica pueden generarse millones de moléculas idénticas, a partir de una molécula de ADN. Esto se puede conseguir en unas horas. La reacción es muy sencilla, necesita cantidades de ADN muy pequeñas y sólo se precisa un tubo de ensayo, algunos reactivos, una fuente de calor y unas pequeñas cadena de nucleótidos que actúan como cebadores.

La reacción es un proceso cíclico que ocurre *in vitro* análogo a la que ocurre en la célula *in vivo* y para ello se requieren los siguientes componentes esenciales (Balbás, 2002).

- a) Un ADN de doble cadena que contiene la información que se quiere amplificar y que actúa como molde.
- b) Dos oligonucleótidos (cebadores o primers) sintéticos como iniciadores de la síntesis, que deben ser complementarios a regiones del ADN molde. Cada oligonucleótido se une a una de las

hebras del ADN en direcciones opuestas, con los extremos 3' orientados hacia el centro. Los oligonucleótidos flanquean al fragmento de ADN que se requiere amplificar.

- c) Una ADN polimerasa termoestable, que resista temperaturas mayores a 90° Celsius como la polimerasa Tag de *Thermus aquaticus*.
- d) Los cuatro dNTPs, con los cuales se sintetiza la nueva hebra de ADN.
- e) Tampón para mantener el pH. Tris-HCl entre 8.3 y 8.8, KCl 50mM y cationes divalentes principalmente iones Mg^{2+} usualmente a 1.5mM.

Según Balbás, (2002) el procedimiento cíclico de la PCR que ocurre en un termociclador, se da en tres pasos:

- ❖ **Desnaturalización:** La muestra se somete a calentamiento hasta aproximadamente 90 °C por unos min para romper los puentes de hidrógeno que le confieren al ADN su estructura de doble hélice. De esta manera las hebras dejan expuestas la información que contiene para que la polimerasa incorpore los nucleótidos correspondientes.
- ❖ **Hibridación:** Implica la unión por puentes de hidrógenos de los oligonucleótidos iniciadores con sus regiones complementarias del ADN molde, a temperaturas aproximadamente entre los 36° y 55 °C.
- ❖ **Elongación:** Se debe incrementar la temperatura hasta los 70 °C aproximadamente, que al ser la temperatura óptima para la función catalítica de la ADN polimerasa Tag, permite la síntesis de las cadenas del ADN a partir del extremo –OH 3' de los cebadores y procede en dirección 5' a 3'.

4.13 Aplicaciones de la PCR

La PCR es una técnica muy eficiente que ha ayudado a desarrollar otras disciplinas biológicas entre las que cita Huertas (2004), se encuentran:

- ❖ **Biología Molecular:** para amplificar fragmentos de ADN para ser clonadas y/o secuenciadas.
- ❖ **Biotecnología:** para la identificación rápida y temprana de animales y plantas transgénicas.
- ❖ **Genética de Poblaciones y Evolutiva:** que se emplea para cartografiar genes mediante estudios de ligamientos y estudiar la evolución dentro de las poblaciones.
- ❖ **Medicina:** para el tratamiento precoz de enfermedades infecciosas como el SIDA.

4.14 Parámetros que afectan las reacciones de la PCR

Según Huertas (2004) existen diversos factores que afectan la eficiencia de la PCR, básicamente cualquiera de los elementos que intervienen en una amplificación mediante PCR puede modular el resultado final.

Entre estos factores ella menciona:

- ❖ **Termociclador:** no todas las máquinas son igualmente eficientes a la hora de amplificar el ADN.
- ❖ **Pureza del ADN:** puesto que las ADN polimerasas empleadas en la PCR pueden ser inhibidas por diversas sustancias presentes en el material a amplificar.
- ❖ **Diseño de cebadores:** estos deben tener una baja estabilidad en pentámeros, no formar dímeros consigo mismo o con la pareja, tener una temperatura de fusión alta y parecidas.
- ❖ **Almacenamiento de los cebadores:** se recomienda guardar los cebadores disueltos en agua destilada estéril tipo milli-QTM y congelarlos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Solución Stock).
- ❖ **ADN polimerasa termoestable:** para soportar las altas temperaturas de la desnaturalización.
- ❖ **Magnesio:** proporcionado por el Cloruro de Magnesio (MgCl_2) es un cofactor necesario para la actividad enzimática de la ADN polimerasa, por lo que es necesario determinar empíricamente para cada polimerasa la concentración óptima de MgCl_2 (Balbás P, 2002).

4.15 RAPD

Los marcadores RAPD (Random amplified Polymorphic DNA) es una técnica basada en la PCR en la que se amplifican secuencias desconocidas de ADN, usando para esto un simple y corto oligonucleótido (Gauer y Cavalli-Molina, 2000). El oligonucleótido o cebador de secuencia arbitraria permite la amplificación al azar de secuencias de ADN a través de lo largo del genoma (Vidal y García, 2000).

Para que la amplificación sea exitosa los cebadores deben hibridar a una distancia limitada típicamente debajo de 5000 pb como máximo (Spooner y col, s.f.) y de 200 pb como mínimo (Tingey y del Tufo, 1993) y en sentido contrario en las hebras de ADN a estudiar, cuando ocurre la amplificación ésta se detecta como una banda en un gel de agarosa por electroforesis. Cada banda en el gel se corresponde a un locus en el que se detectan dos alelos. Uno es definido por el producto de la amplificación y el otro por la ausencia de la amplificación (Fontdevila y Moya, 1999).

La mayoría de las variaciones genéticas detectadas con esta técnica probablemente resultan de sustituciones de pares de bases o de inserciones/deleciones que modifican (o eliminan) el sitio de hibridación con el cebador, o inserciones en la secuencia genómica que separa a los cebadores hibridados a una distancia que no permite la amplificación. Cada uno de estos cambios resulta en la presencia/ausencia de un fragmento RAPD particularmente (Williams y col, 1990). Los productos de estas amplificaciones pueden ser polimórficas y ser usados como marcadores genéticos (Hu y Quiros, 1991).

La ventaja de la técnica RAPD es que por no requerir información sobre la secuencia de ADN a estudiar, constituye un método sencillo capaz de detectar de manera rápida un gran número de marcadores genéticos en cantidades mínimas de ADN y existen protocolos rápidos para la extracción del ADN (Rafalski y Tingley, 1993). En esta técnica no es preciso secuenciar ni hibridar radioactivamente ya que las bandas se observan fácilmente al teñirlos con bromuro de etidio. El nivel de polimorfismo que se detecta se considera medio al compararla con otros marcadores y el costo de instalación y funcionamiento se considera bajo (Fontdevila y Moya,

1999). Además poseen la gran ventaja de poder seleccionar y elegir sólo los mejores marcadores entre un gran número de bandas (Díaz, 2001).

Sin embargo, los RAPDs presentan una serie de inconvenientes: tienen una herencia dominante que hace que los heterocigotos sean indistinguibles de los homocigotos y por lo tanto, no proporcionan directamente información alélica. Bandas que coemigran en los geles pueden no ser homólogas (no provienen del mismo locus) lo que confundiría la interpretación fenotípica de las mismas, pueden presentarse problemas de reproducibilidad entre los laboratorios debido a diferencias en la concentración de los componentes en la mezcla de reacción, polimerasa y termociclador empleado, además; la presencia de bandas de baja intensidad puede llevar a cometer errores en la lectura de los perfiles de bandas. Los errores al analizar los datos se obvian o disminuyen cuando se eligen las bandas intensamente teñidas y claramente discernibles y que aparecen constantemente en distintas réplicas (Rieseberg, 1996).

A pesar de los inconvenientes señalados, la metodología de los RAPDs ha sido empleada en una amplia gama de estudios y sobre diferentes tipos de genomas debido a que autores como Lynch y Milligan (1994) y Apostol y col. (1996) han propuesto estrategias para calcular parámetros poblacionales similares a los obtenidos con datos de tejidos haploides o codominantes (Isabel y col., 1995). Por ejemplo, se han realizado estudios sobre la diversidad y determinación de relaciones genéticas entre cultivares o variedades de una misma especie, en estudios de diversidad genética entre poblaciones naturales, en estudio de Biología Reproductiva, en Sistemática y Taxonomía Molecular, en análisis de flujo génico interespecífico, en detección de híbridos, etc. (Karp y Edwards, 1997; Schierwater, 1995; Arnholdt-Schmitt, 2000).

Actualmente existen otros métodos basados en el ADN para revelar mas variabilidad molecular como RFLP, AFLP, entre otros, pero ninguno de ellos resulta óptimo en todas las condiciones (Fontdevila y Moya, 1999).

4.16 Uso de los RAPDs en la detección de la variación somaclonal

Diversos autores han aplicado la técnica RAPD para estudiar la variabilidad genética en diferentes especies regeneradas por la técnica de cultivo *in vitro* para detectar variantes somaclonales y han encontrado los RAPDs una técnica muy eficiente y fiable. Por ejemplo Vidal y García (2000) la utilizaron para detectar variación somaclonal en *Musa*, Brown y col. (1993), en *Triticum aestivum*, Rani y col. (1995), en *Populus deltoide*, Bouman y Kiujjpers (1994) en begonia, en ajo Al- Zahim y col. (1999), y en arroz Yang y col. (1999). En comparación con los marcadores isoenzimáticos y los RFLPs (Restriction Fragments Length Polymorphism) que revelan cambios en una limitada fracción del genoma, los marcadores RAPDs son capaces de amplificar gran porción del genoma en dependencia de la frecuencia de los sitios de unión del cebador al ADN de forma aleatoria. Algunos cebadores generan muchas bandas de tal forma que los variantes somaclonales pueden ser detectados siempre y cuando el cambio de una base resulte en la reducción o adición en el sitio de unión del cebador. Los RAPDs pueden discriminar entre plantas regeneradas aún cuando aparentemente no hayan efectos morfológicos (fenotípicos) de la variación somaclonal (Veilleux y Johnson, 1998).

Otros autores en cambio, no han encontrado polimorfismo entre plantas regeneradas de callos embriogénicos por lo que afirman que la técnica RAPD no es lo suficientemente sensitiva para detectar pequeños cambios genéticos al menos que se usen muchos cebadores. Anastassopoulus y Keil (1996), llegó a una conclusión similar al analizar variantes fenotípicos de *Alstroemeria*, 8 de los mutantes resultaron indistinguibles del control usando RAPD. Fourré y col. (1997), usaron RAPD para caracterizar los variantes somaclonales obvios entre *Norway spruce*, sin encontrar variación entre algunos de ellos, por lo que concluyen que los RAPDs u otros marcadores moleculares podrían pasar por alto importante variación, por lo que la ausencia de RAPDs polimórficos no son garantía de estabilidad genética.

Quizás los resultados anteriormente citados se deban a que como afirma Aagaard y col. (1995), la variación generada por los RAPDs es detectada principalmente en el ADN repetitivo no codificante, lo que refleja una variación neutral mientras que las alozimas o secuencias de ADN codificantes representan variación en genes funcionales.

4.17 Electroforesis

Es una técnica muy utilizada con las proteínas y los ácidos nucleicos, basada en el principio de que moléculas con carga son capaces de desplazarse ante un campo eléctrico en la dirección opuesta a la carga neta que contienen, cuando las muestras se depositan en un soporte. Los materiales de soporte más corrientes son la poliacrilamida (recomendada para polinucleótidos pequeños), un polímero reticulado soluble en agua, y la agarosa un polisacárido (recomendada para polinucleótidos grandes) (Mathews, y Van Holde 1998). Por medio de la electroforesis en gel es posible separar mezclas de determinadas macromoléculas, como polipéptidos o fragmentos de ADN.

El radio de migración del ADN a través de un gel de agarosa depende de los siguientes parámetros según Surzycki (s.f):

- ❖ **Tamaño de la molécula de ADN:** El movimiento a través del gel es inversamente proporcional al tamaño de la molécula y por consiguiente al peso molecular, la migración será más rápida para las moléculas de menor tamaño.

- ❖ **La concentración del gel de agarosa y el voltaje aplicado:** Al aumentar la concentración de agarosa en el gel la separación se vuelve más eficiente, por otro lado el rango de migración de los fragmentos de ADN es directamente proporcional al voltaje aplicado, consecuentemente la fortaleza del campo aplicado debe ser entre 0.5 V/cm y 10 V/ cm. En general altas resoluciones son llevadas a cabo a bajo gradientes de voltaje; pequeñas moléculas de ADN deben correr a altos gradientes de voltaje para prevenir su difusión durante la electroforesis.

- ❖ **La forma del ADN:** Un plásmido de ADN puede existir en tres diferentes conformaciones, molécula circular superenrollada, molécula circular relajada y molécula lineal; bajo muchas condiciones la molécula circular superenrollada migra más rápido que la molécula lineal en dependencia del tampón.

❖ **El tampón usado para la electroforesis:** Diferentes tampones son usados para la electroforesis en gel de agarosa, estos son: tampón EDTA Tris-acetato (TAE), tampón EDTA Tris-borato (TBE) y tampón EDTA Tris-fosfato (TPE).

Tampón TAE: (40 mM Tris-base, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA). Es el tampón más usado para electroforesis en gel de agarosa, tiene una baja capacidad de tamponizar; es recomendado para tiempos cortos de corridas a relativamente altos voltajes.

Tampón TBE: (89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA). Tiene una alta capacidad de tamponizar, puede ser usado para moléculas de ADN con menos de 12000 pb, se obtienen mejores resultados que con el tampón TAE para fragmentos de ADN con menos de 1000 pb. La movilidad del ADN en este tampón es dos veces más lenta que con el tampón TAE, debido a la baja porosidad del gel de agarosa en presencia del borato.

Tampón TPE: (89 mM Tris-base, 23 mM H_3PO_4 y 2.5 mM EDTA). Tiene alta capacidad de tamponizar comparado con el tampón TBE, la movilidad del ADN es similar al tampón TAE debido al tamaño del poro formado durante su polimerización.

V. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología, de la Facultad de Ciencias de la UNAN-León. Se utilizaron un total de 35 muestras de plántulas regeneradas *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejido de la UNAN-León. (Ver Anexos foto 1).

5.1 Obtención de la muestra

Las muestras (plántulas de *Musa*), fueron suministradas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Se analizaron un total de 35 muestras, pertenecientes a cinco variedades FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola), representando a cada variedad siete muestras (enumeradas del 1 al 7). Las muestras se obtuvieron sin tomar en cuenta ningún criterio de selección, puesto que todas crecen en el mismo tipo de medio de cultivo.

El material vegetal parental procede de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola y las variedades fueron obtenidas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Internacional de Tránsito de *Musa*, ubicado en Bélgica en la Universidad Católica de Lovaina bajo la dirección del INIBAP (Red Internacional Para el Mejoramiento de Plátanos y Bananos).

En la tabla 3 se especifican los datos genotípicos de las 5 variedades de *Musa* analizadas en este estudio.

Tabla 3. Tipos de fruta y datos genotípicos de las 5 variedades de *Musa* analizadas en este estudio.

Variedad	Tipo de fruta	Dotación Cromosómica
FHIA-01	Guineo	Tetraploide
FHIA-03	Guineo cuadrado	Tetraploide
FHIA-17	Banano	Tetraploide
FHIA-20	Plátano	Tetraploide
FHIA-25	Guineo	Triploide

5.2 Extracción de ADN

Para obtener los mejores resultados del proceso de extracción del ADN se trabajó con tejido joven (como hojas en crecimiento) a como lo recomienda Hoelzel (1998) y para este proceso se modificó el protocolo generado por Gawel y Jarret, (1991). Para obtener ADN de *Musa* a través de los siguientes pasos:

1. Se hicieron 3 discos del tejido vegetal realizando el corte por presión con la tapa del tubo Eppendorf (los discos foliares son equivalentes a un total de aproximadamente 91 μ g).
2. Para extraer el ADN se sumergió el tejido en 1 ml de un Tampón de Extracción, donde se maceró con la ayuda de un triturador de tejidos con su motor inalámbrico. Dicho tampón contiene:
 - Detergente (CTAB) al 2 %,
 - TRIS 100 mM
 - NaCl 1.4 M.
 - EDTA 20 mM, como agente quelante.
 - β -mercaptoetanol al 0.1 %, el cual se aplica al momento de realizar la extracción
3. Se colocan las muestras en baño maría por 30 min a una temperatura de 65 °C.
4. Para separar las proteínas y restos celulares de los ácidos nucleicos se agregó en cada tubo un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción de 24:1 (v/v) luego se homogenizó la mezcla por inversión.
5. Para lograr la separación de las fases se centrifuga por 10 min a 12000 rpm a una temperatura de 4 °C.
6. Se extrae el sobrenadante (primera fase) de cada tubo con una micropipeta, para transferirlo a un tubo limpio.
7. Para precipitar los ácidos nucleicos se agrega un volumen igual de isopropanol frío al 100% y se mezcla por inversión, dejándolo precipitar a -20 °C por una noche.
8. Para precipitar el ADN se centrifuga por 10 min a 12000 rpm.
9. Se vierte el sobrenadante y se lava el ADN con 300 μ l de etanol al 70%.
10. Nuevamente se centrifuga en las mismas condiciones.

11. Se vierte el etanol y se deja secar el sedimento por 15 min a temperatura ambiente.
12. El ADN se disuelve con 20 a 30 μl del tampón TE (Tris EDTA) para ello se mezcla suavemente con la ayuda de la micropipeta.
13. Se añade ARNasa (10 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) a cada tubo con el fin de degradar el ARN y se incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min.
14. Finalmente se conserva el ADN a -20°C .

5.3 Chequeo, cuantificación y dilución de ADN

Para verificar la calidad del ADN extraído se realizó un chequeo mediante electroforesis en un mini gel de agarosa al 0.8% a 90 voltios durante 30 min. El gel utilizado para chequear el ADN se prepara disolviendo la agarosa en un tampón TAE 1X, aplicando calor a la mezcla hasta fundirla; luego se deja enfriar aproximadamente a 40 $^{\circ}\text{C}$ y se deposita en una cubeta a la que se le ponen sus correspondientes peines para que se puedan formar los pozos donde se depositará la muestra. Una vez solidificado el gel se retiran los peines y se coloca en una cubeta de electroforesis que contiene buffer TAE 1X.

Para cuantificar el ADN obtenido se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02. Cada muestra se preparó con un factor de dilución de 200 (5 μl de la muestra y 995 μl de agua destilada), la que se deposita en una cubeta de cuarzo y se lee a una longitud de onda de 260 nm. Una vez determinada la concentración del ADN obtenido, se prepararon diluciones a una concentración final de 5 ng/ μl las que se guardan a -20°C para conservar en buen estado las muestras hasta su amplificación.

5.4 Selección de cebadores

Para seleccionar los cebadores a utilizar con las 35 muestras de este estudio, inicialmente se realizaron pruebas preliminares, ensayando un total de 53 cebadores en tres muestras elegidas al azar entre todas las variedades. Como criterio de selección para los cebadores se eligieron los que generaron las bandas con mayor nitidez y que además fueran reproducibles.

En la tabla 4 se muestran los cebadores que se ensayaron en este estudio

Tabla 4. Cebadores OPERON probados en 3 muestras de *Musa* para seleccionar aquellos que se van a usar en este estudio.

No	Cebador	No	Cebador	No	Cebador	No	Cebador
1	S-02	15	K-13	29	Y-14	43	K-03
2	S-07	16	J-14	30	W-14	44	K-08
3	E-19	17	P-08	31	T-20	45	K-09
4	E-12	18	M-01	32	T-17	46	K-11
5	J-02	19	H-18	33	T-19	47	K-12
6	A-04	20	S-18	34	T-10	48	I-06
7	H-07	21	R-02	35	R-10	49	I-09
8	Q-02	22	N-12	36	R-19	50	B-05
9	O-01	23	N-09	37	R-06	51	B-10
10	AF-14	24	T-08	38	F-01	52	G-05
11	AE-16	25	R-06	39	K-18	53	F-05
12	D-07	26	C-18	40	M-04		
13	AD-10	27	U-05	41	M05		
14	AG-14	28	U-16	42	M06		

5.5 Preparación de la mezcla de reacción

Se prepara una mezcla que contiene todos los componentes para realizar las reacciones de amplificación del ADN a través de la técnica RAPD.

- MgCl₂ 3 mM
- Tampón PCR 1 X (1 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.15 mM MgCl₂, 5 mM KCl)
- dNTPs 200 μM
- Cebadores 5 μM
- Taq polimerasa 1 U
- ADN 25 ng
- Hasta un volumen final de 25 μl con agua estéril

Se prepara primero el volumen total de todos los componentes de la mezcla de reacción para todas las muestras a amplificar sin el ADN. Luego se distribuye 20 μ l de esta mezcla a cada tubo Eppendorf de 0.2 ml a los que previamente se le agregó 5 μ l de ADN (5ng/ μ l).

5.6 Procesos de amplificación RAPD

Para la amplificación del ADN se utilizó el reportado por Gawel, y Jarret, (1991), con algunas modificaciones específicamente en la temperatura de anillamiento la cual se cambió de 36° a 40 °C.

Se coloca el tubo con 25 μ l de la mezcla de reacción y una gota de aceite para evitar la evaporación, en un termociclador AMPLITROM® II THERMOLYNE, el cual se programó con los siguientes pasos:

- ❖ Un primer paso de desnaturalización: 3 min a 94 °C.
- ❖ Repetición de 40 ciclos de amplificación, en cada uno de los cuales ocurren tres pasos:
- ❖ Desnaturalización: 1 min a 94 °C.
- ❖ Hibridación del primer: 1 min a 40 °C.
- ❖ Elongación: 2 min a 72 °C.
- ❖ Al finalizar los 40 ciclos se programó una elongación final: 7 min a 72 °C.

Finalmente el termociclador se programa a 4 °C, por tiempo indefinido para conservar las muestras amplificadas, en caso que no se puedan retirar inmediatamente del termociclador.

5.7 Chequeo de los fragmentos de amplificación

Para chequear el producto de la amplificación, se añade 5 μ l de azul de bromofenol a la mezcla de reacción. Se extrae toda la muestra previamente limpia de aceite, para depositarla en un gel de agarosa al 1.4 % sumergido en un tampón TAE 1X.

Se depositó además en el primer carril del gel 5µl de un ADN marcador de peso molecular, con bandas de peso molecular conocido (1 Kb). Después de la migración por electroforesis a 90 voltios se tiñó el gel colocándolo por 30 minutos en una cubeta que contiene una solución de bromuro de ethidio (0.5µg/ml). Finalmente los fragmento amplificados son visualizados y fotografiados con una cámara instantánea Polaroid sobre una lámpara UV (260nm), para luego realizar unos esquemas que fueron utilizados para construir la matriz de presencia ausencia (Ver Anexos Esquemas 2 al 12).

5.8 Análisis de datos

Los patrones de bandas obtenidos en los geles de electroforesis fueron utilizados para construir una matriz de presencia-ausencia (Ver Anexos tabla 7), en la cual se designa 1 a la banda presente y 0 a la banda ausente. A continuación se consideran únicamente las bandas polimórficas, considerando como tales las que presentan al menos una banda ausente o presente en al menos un individuo de los 35 analizados.

A partir de la matriz de marcadores con la ayuda del paquete estadístico NTSYS (Rohlf, 1993), primero se calcula el coeficiente de similitud con el índice de Jaccard, y con los datos obtenidos se construye la matriz de similitud utilizando el programa Similary Qualitative-; luego se realizó un agrupamiento en UPGMA con el programa Shan Clustering el cual muestra un árbol con medidas no definidas. Para obtener el dendrograma se usa el programa Tree Display Graphics, el cual agrupa a los individuos de acuerdo a su similitud genética.

El porcentaje de bandas polimórficas para cada cebador con todas las variedades y para cada variedad con todos los cebadores fue calculado dividiendo las bandas polimórficas entre el número total de bandas para luego multiplicar por 100 dicho dato. Finalmente se calculó el promedio del porcentaje polimórfico encontrado en las cinco variedades analizadas con los 11 cebadores y el promedio de cada cebador en las cinco variedades.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ADN obtenido

El protocolo utilizado para la extracción del ADN generó ADN de buena calidad observándose bandas definidas, sin arrastre y con un peso molecular superior a las 12000 pb como se puede observar en la foto 2. Se obtuvo un promedio de aproximadamente 352.1 ng/ μ l de ADN de *Musa*. La calidad de ADN se consideró apropiada para la amplificación por RAPD y la cantidad suficiente para el análisis de las variedades de este estudio.

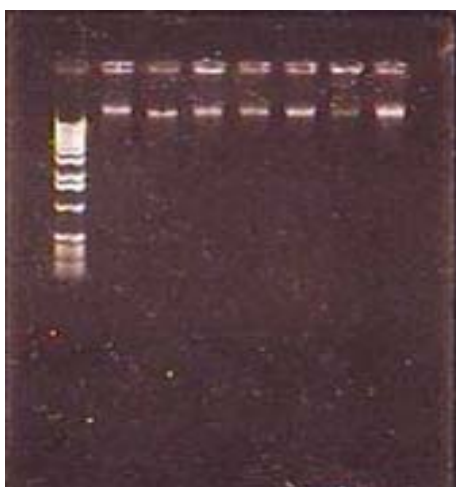


Foto 2. Extracción de ADN de las 7 muestras de la variedad FHIA-25 (Pozos 2 a 8). Pozo 1 marcador molecular Ladder.

6.2 Patrones de bandas obtenidas con RAPD

Para estudiar la variación somaclonal utilizando la técnica RAPD se ensayaron 53 cebadores en 3 individuos de entre todas las variedades, los cuales fueron tomados al azar; de ellos se seleccionaron a los mejores 11 cebadores los cuales presentaron productos de amplificación reproducibles, claramente visibles y con suficiente separación entre si, lo que facilita la lectura de las bandas y evita cometer errores tales como considerar a dos bandas como una o viceversa (Ver Anexos, Fotos 4, 5 y 6). Para este estudio se consideraron los cebadores con las características anteriores independientemente de si generaban polimorfismo o no en todas las variedades analizadas, ya que algunos generan polimorfismo en una variedad, pero no necesariamente en otra, puesto que obviamente son variedades diferentes con propiedades genéticas propias. Por ejemplo el cebador I-06 sólo generó polimorfismo en FHIA-17 y no

diferencia genéticamente los clones de las demás variedades, en cambio A-04 generó polimorfismo en todas las variedades excepto en FHIA-25. En otro estudio en *Musa* reportado por Vidal y García (2000), se utilizaron 10 cebadores de OPERON los que dieron resultados reproducibles, pero sólo dos fueron capaces de diferenciar entre clones de bananas, esto indica que no necesariamente usaron cebadores que generaran polimorfismo. Así mismo Nayak y col. (2003), utilizaron 12 cebadores para detectar cambios genéticos en clones de Jamrosa, de los cuales sólo 6 fueron capaces de mostrar polimorfismo entre los somaclones. Sin embargo en este trabajo de forma general los 11 cebadores utilizados generaron polimorfismo.

Los 11 cebadores seleccionados produjeron un total de 68 bandas las cuales variaron de 650 a 5000 pb, el número de bandas por cada cebador utilizado aparece en la tabla 4. Los cebadores que produjeron el mayor número de bandas fueron D-07, H-07, B-05 y N-09 con un total de 10, 8, 8 y 7 bandas respectivamente, teniendo los restantes cebadores un promedio de 5 bandas. **Tabla 5. Secuencia y número de bandas producidas por cada cebador.**

Cebador	Secuencia	No de bandas totales	Bandas Monomórficas	Bandas Polimórficas
B-10	CTG GTG GGA C	4	0	4
G-05	CTG AGA CGG A	5	0	5
P-08	ACA TCG CCC A	6	1	5
I-09	TGG AGA CCA A	6	0	6
I-06	AAG GCG GCA G	5	0	5
B-05	TGC GCC CTT C	8	2	6
S-07	TCC GAT GCT G	5	0	5
N-09	TGC CGG CTT G	7	0	7
A-04	AAT CGG GCT G	4	0	4
H-07	CTG CAT CGT G	8	0	8
D-07	TTG GCA CGG G	10	0	10
Total		68	3	65

La frecuencia de bandas polimórficas y el porcentaje de polimorfismo generado por cada cebador en cada variedad y en cada cebador con todos los cebadores se muestra en la tabla 5

donde se aprecia que la frecuencia de bandas polimórficas es diferente para cada cebador en cada una de las variedades. El mayor número de bandas polimórficas en una variedad lo generaron los cebadores H-07 y D-07 con un total de 6, dicha frecuencia fue encontrada en la variedad FHIA-03. Los que generaron menor polimorfismo fueron I-09 con una sola banda polimórfica en FHIA-25 y el cebador P-08 en FHIA-17 y FHIA-25. Los cebadores B-10, G-05, I-09, I-06, B-05, S-07 y A-04 no fueron capaces de detectar variación somaclonal en al menos una variedad.

Tabla 6. Número y porcentaje (entre paréntesis) de la frecuencia de bandas polimórficas obtenidas con cada cebador en todas las variedades analizadas y de cada variedad con todos los cebadores utilizados.

Cebador	Total de bandas	Variedad					Promedio
		FHIA-01	FHIA-03	FHIA-17	FHIA-20	FHIA-25	
B-10	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	1 (25)
G-05	5	2 (40)	0 (0)	0 (0)	4 (80)	0 (0)	1.2 (24)
P-08	6	4 (66.67)	3 (50)	1 (16.67)	2 (33.33)	1 (16.67)	2.2 (36.67)
I-09	6	0 (0)	0 (0)	5 (83.33)	2 (33.33)	1 (16.67)	1.6 (26.67)
I-06	5	0 (0)	0 (0)	4 (80)	0 (0)	0 (0)	0.8 (16)
B-05	8	0 (0)	2 (25)	5 (62.5)	0 (0)	2 (25)	1.8 (22.5)
S-07	5	0 (0)	5 (100)	0 (0)	2 (40)	0 (0)	1.4 (28)
N-09	7	3 (42.85)	4 (57.14)	4 (57.14)	5 (71.43)	4 (57.14)	4 (57.14)
A-04	4	2 (50)	2 (50)	2 (50)	3 (75)	0 (0)	1.8 (45)
H-07	8	2 (25)	6 (75)	3 (37.5)	3 (37.5)	4 (50)	3.6 (45)
D-07	10	4 (40)	6 (60)	4 (40)	2 (20)	2 (50)	3.6 (36)
Promedio		1.55 (24.05)	2.73 (42.48)	2.73 (43.38)	2.73 (35.51)	1.36 (19.13)	3.6 (32.91)

De los 11 cebadores utilizados, el cebador H-07 generó patrones diferentes de bandas en las 5 variedades analizadas (Ver Anexos Esquema 1), lo que lo constituye en este estudio como el marcador que permitiría diferenciar molecularmente cada variedad, identificando por ejemplo los individuos de cada variedad en una fase temprana del desarrollo de las plantas.

6.3 Nivel de polimorfismo encontrado en *Musa*

El cebador que produjo el mayor porcentaje de polimorfismo fue N-09 con un 57.14 (ver tabla 6) a pesar que no es de los que generaron mayor número de bandas, en cambio el que generó menor porcentaje de polimorfismo fue I-06 con un 16 % aún cuando no es el que generó el menor número de bandas, esto es debido a que solo detecto polimorfismo en una de las cinco variedades (FHIA-17).

Todas las variedades analizadas en este estudio presentaron variación somaclonal. Las variedades que mostraron mayor variabilidad genética fueron FHIA-17 y FHIA-03 con un porcentaje de polimorfismo de 43.38 y 42.48 respectivamente; la variedad que mostró mayor estabilidad genética con estos cebadores fue FHIA-25 con un porcentaje de polimorfismo de 19.13. La frecuencia de variación somaclonal se considera altamente dependiente del genotipo y del medio de cultivo, por ejemplo diferentes niveles de citoquinina producen diferencias en la variación somaclonal (Pancholi y col., 1996), también depende de la fuente del explante y del método de regeneración, por ejemplo los meristemas organizados se consideran más resistentes a los cambios genéticos que los callos desorganizados (Shenoy y Vasil, 1992 citados por Goto y col.1998). Igualmente Bogani y col. (1996), concluyen en su análisis de clones de callos de tomate que el nivel de variación somaclonal depende del genotipo inicial tanto como del medio de cultivo en el que los clones hayan sido mantenidos.

Sin embargo, en la generación de los clones de este estudio no hay diferencia ni en el componente ni en las concentraciones de los diferentes componentes del medio de cultivo, por lo que una posible explicación en los diferentes niveles de polimorfismo detectado en las diferentes variedades, se podría deber principalmente a su genotipo (para citar uno de los posibles mecanismos de variación que se reportan en el marco teórico). Las variedades de

plátanos y bananos en general son originadas por el cruce entre *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B). En el trabajo de Pancholi y col. (1996) se reporta que es mayor la variabilidad en el genoma A que en el B. En los resultados de este estudio se puede observar en general cierta tendencia a que esto se cumpla, pero no en su totalidad, porque si ordenamos de mayor a menor el porcentaje de variación detectada, una de las variedades que presentó mayor variación somaclonal fue la FHIA-17 (43.38%) que es tetraploide y efectivamente es la única de las variedades analizadas que todo su genoma es A (AAAA), sin embargo la otra variedad que presentó casi el mismo porcentaje de polimorfismo es la FHIA-03 que también es tetraploide pero sólo la mitad de su genoma es A (AABB). A las que les corresponde el tercer y cuarto lugar presentan un triple de genoma A con un mismo genotipo (AAAB) y son la FHIA-20 con un 35.51% y la FHIA-01 con un 24.05%. Por último la variedad que presentó menor polimorfismo con un 19.13% fue la FHIA-25 que es la única triploide (AAB) y que tiene el mismo contenido de genoma A que la FHIA-03. Al comparar estas dos que poseen la misma cantidad de genoma A, pero que difieren en la cantidad de variación somaclonal, se puede aducir que esto se debe a que las tetraploides (FHIA-03) sean genéticamente más variables que las triploides (FHIA-25), porque en un ensayo con la técnica AFLP Crouch y col. (1999), confirmaron reportes previos con VNTR de una alta frecuencia de recombinación durante la formación de gametos en los tetraploides, en ese mismo estudio tanto los análisis de RAPD como de VNTR sugieren una alta frecuencia de recombinación homóloga lo que podría explicar este resultado. En conclusión de las cinco variedades cuatro presentan un porcentaje de polimorfismo de acorde al contenido de genoma A, a excepción de la FHIA-03, la que presentó alto nivel de polimorfismo, no por su contenido de genoma A sino quizás por su condición de tetraploide.

El polimorfismo detectado por RAPD revela los cambios generados en el ADN de los clones ya sea por sustituciones, deleciones o inserciones produciendo variación somaclonal. En este estudio en las cinco variedades de *Musa* los 11 cebadores utilizados generaron un total de 68 bandas de las cuales 65 resultaron polimórficas.

Crouch y col. (1999), compararon tres tipos de marcadores moleculares basados en la PCR (RAPD, VNTR Y AFLP) para detectar el nivel de polimorfismo entre los genotipos parentales y la progenie de *Musa* utilizados en un programa de mejora genética y las tres técnicas

detectaron altos niveles de polimorfismo entre ellos, aunque estas no eran regeneradas *in vitro*. Esto refleja la variación preexistente en el genotipo inicial de *Musa*, ante de ser sometido a técnicas *in vitro*.

Los resultados en las cinco variedades indican que el número de cebadores ensayados en este estudio es suficientemente apropiado para detectar diferencias entre clones dentro de una variedad y que los marcadores RAPDs son altamente eficientes para detectar variación somaclonal en *Musa* en concordancia con los resultados de otros autores, por ejemplo Vidal y García (2000), en el estudio de variación somaclonal en *Musa* resistente a la Sigatoka amarilla.

La técnica RAPD posee la capacidad de diferenciar entre plantas regeneradas *in vitro* aún cuando no haya aparentes efectos morfológicos de la variación somaclonal (Veilleux Johnson, 1998), igual manifiestan Müller y col. (1990), en un trabajo realizado en arroz regenerados de callos embriogénicos con la técnica RFLP en el que el 19% de las plantas regeneradas de callos embriogénicos presentaron variación al analizarse con esta técnica y tal variación no estaba asociada con cambios fenotípicos obvios.

Para las plantas analizadas en este estudio tampoco se ha reportado diferencias fenotípicas evidentes, ni en el período de aclimatación ni en el de cultivo en el campo de estas variedades, pero esto se puede explicar por el hecho de que no se hayan realizado estos tipos de estudios, puesto que la variación somaclonal no siempre es evidente y se puede manifestar anatómica, morfológica o bioquímicamente (Vidal y García, 2000), como ya se ha mencionado anteriormente. Otra explicación para la gran cantidad de variación somaclonal detectada por esta técnica se debe a que los marcadores RAPDs se generan utilizando cebadores dirigidos al azar en el genoma y que por lo general la mayor parte del genoma de las plantas está constituido de regiones no codificantes altamente repetitivas, por lo que de acuerdo con Aagaard y col. (1995), gran parte de la variación molecular detectada con los RAPDs es neutral, es decir, no es detectada por la selección natural, en comparación a la detectada con marcadores codominantes como las isoenzimas y los RFLPs que representan variaciones en secuencias de ADN codificantes o genes funcionales y la selección natural actúa más fuertemente sobre las regiones codificantes.

Los RAPDs en general no son utilizados para establecer la base genética de la variación somaclonal (Nayak y col., 2003) sino para detectarla, sin embargo hay trabajos en lo que esto también ha sido posible (Hashmi y col., 1997). Como reportan Villeux y Johnson (1998), el éxito en el uso de marcadores moleculares para identificar variantes somaclonales ha sido errático puesto que en algunos casos en que las variantes fenotípicas son obvias no ha sido detectada por los marcadores y en otros casos los marcadores utilizados en plantas regeneradas fenotípicamente normales detectan polimorfismo. Estos autores consideran que ello ejemplifica la enormidad de los genomas de las plantas y la limitada ventana que ofrecen los marcadores para observarla, puesto que la probabilidad de encontrar un marcador que se corresponda directamente con el cambio fenotípico observado es pequeña (aunque ocasionalmente se reportan) y dado que la mayor parte del genoma de las plantas superiores es no codificante la probabilidad de encontrar un marcador que no se corresponde con un efecto fenotípico es alta. Los autores concluyen que a pesar de ello los marcadores han sido y seguirán siendo utilizados para analizar la variación somaclonal, como una técnica que presenta ventajas en su aplicación y en la comprensión del genoma de las plantas.

6.4 Análisis del dendrograma

Se obtuvo un dendrograma utilizando el paquete estadístico NTSYS (Rohlf, 1993) a partir de una matriz de presencia-ausencia que es construida con los marcadores RAPDs obtenidos de las amplificaciones en el cual se agrupan los individuos analizados de las diferentes variedades por similitud genética, lo que permite estimar el porcentaje de variación entre ellos (Ver figura 1).

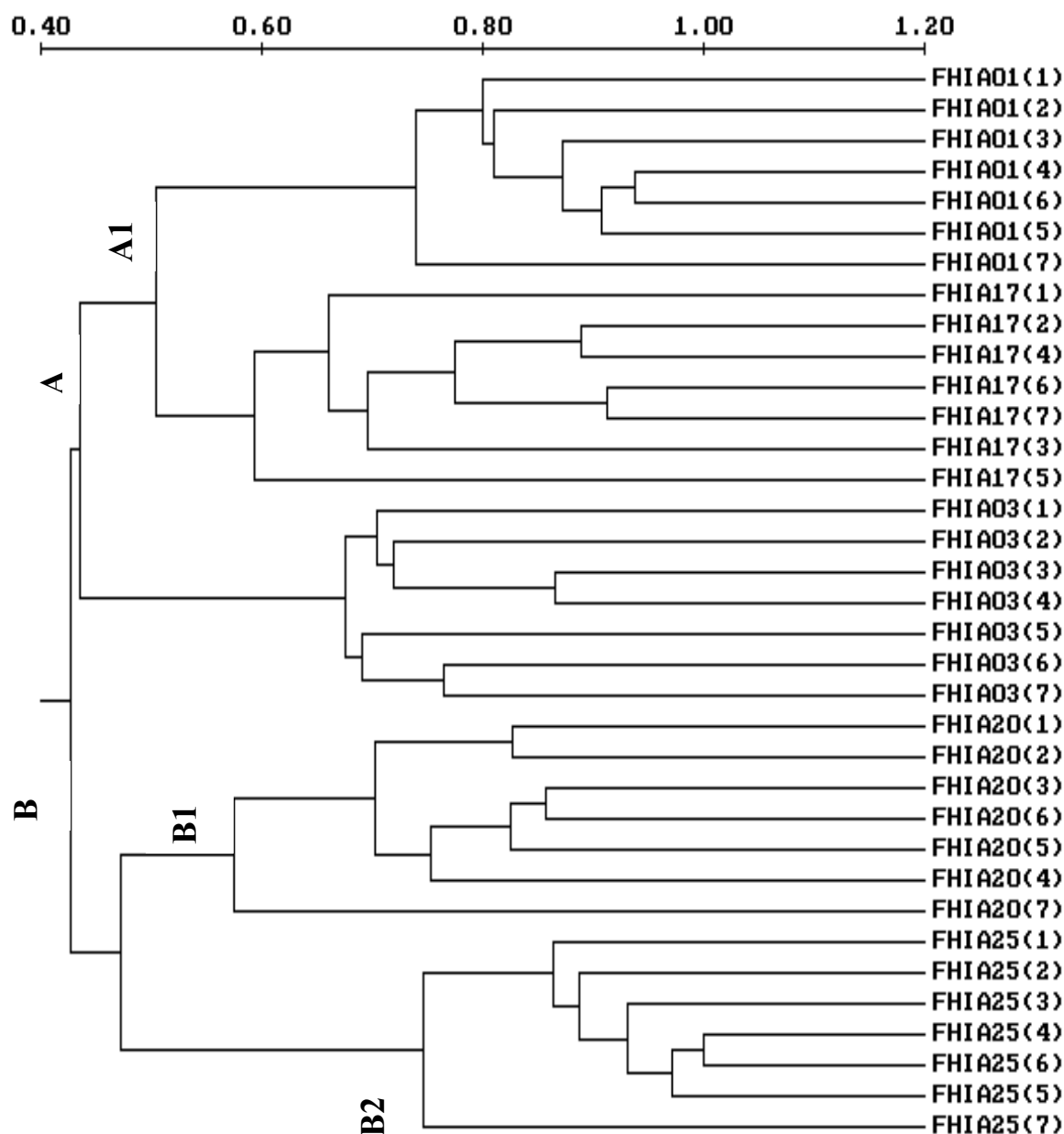


Figura 1. Dendrograma generado con el método de agrupamiento UPGMA, a partir de las similitudes genéticas para cinco variedades de *Musa sp.*

Todas las muestras de las cinco variedades se relacionan con aproximadamente un 47% de similitud genética, el cual no se puede considerar bajo dado que las muestras pertenecen a variedades diferentes. Se observan un total de 2 agrupamientos principales que pueden denominarse A y B. A su vez pueden ser subdivididos cada uno en subgrupos. El grupo A se subdivide en dos subgrupos A1 y A2. En el subgrupo A1 se ubican todos los individuos de las

variedades FHIA-01 y FHIA-17 y en el subgrupo A2 todos los individuos de FHIA-03. El grupo B se subdivide en B1 y B2 en los que se encuentran todos los individuos de las variedades FHIA-20 y FHIA-25 respectivamente, lo que demuestra una estrecha relación genética entre los individuos dentro de cada variedad estudiada.

Es de hacer notar que 3 de las 4 variedades tetraploides (FHIA-01, FHIA-17 y la FHIA-03) se encuentran en el mismo grupo A, estas tres variedades presentan mayor similitud genética con la otra variedad tetraploide (FHIA-20) que se ubica en el grupo B con la variedad triploide FHIA-25. Los individuos de las variedades FHIA-01 y FHIA-17 son genéticamente más similares entre si (tienen en común la cantidad de genoma A), que con los individuos de la FHIA-03 que contiene menor genoma A que los dos anteriores. Dentro del grupo A los individuos que presentan una similitud genética más estrecha son los individuos 4 y 6 de la FHIA-01 con aproximadamente un 93% y el individuo con menor similitud dentro de todo el grupo A es la muestra 5 de la FHIA-17 con aproximadamente un 62%. Dentro del grupo B los individuos más similares genéticamente entre si son los individuos 4 y 6 de la FHIA-25 con un 100% de similitud siendo también por lo tanto los más similares entre si de todos los 35 individuos analizados en este estudio, lo que significa que sólo el 5.71% de los individuos analizados se detectan como clones, lo que permite inferir la cantidad de variación somaclonal presente en estas variedades. Siempre en el grupo B el individuo 7 de FHIA-20 es el menos similar genéticamente dentro del grupo con sólo un 60%.

El dendrograma (Ver Figura 1) indica que los individuos de las variedades FHIA-01 y FHIA-25 son los que están más estrechamente relacionados entre sí que los individuos de las otras variedades porque tienen una similitud genética de 76% y 77% respectivamente (24 % y 23% de diferencia genética) coincidiendo con el porcentaje de polimorfismo puesto que son las que presentan los menores porcentajes de polimorfismo (Ver Tabla 6). En cambio los individuos de las variedades FHIA-17, FHIA-20 y FHIA-03 tienen una similitud genética menor de 63%, 62% y 69% respectivamente (por lo tanto una mayor diferencia genética 37% ,38% y 31%) Estas tres variedades son las que presentan (aunque no en ese orden) el mayor porcentaje de polimorfismo como se puede observar en la Tabla 6.

VII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

1. Once cebadores de OPERON generaron un total de 68 bandas RAPDs de los cuales 65 resultaron polimórficos en las cinco variedades de *Musa* analizadas.
2. Los cebadores que generaron mayor rendimiento fueron H-07 y D-07 con 6 bandas polimórficas en la variedad FHIA-03.
3. El cebador que produjo el mayor porcentaje de polimorfismo en todas las variedades analizadas fue el N-09 con un 57.14%.
4. El cebador H-07 fue capaz de diferenciar molecularmente cada variedad al generar un patrón de bandas diferentes para cada una de ellas.
5. Todas las variedades presentaron polimorfismo producido por variación somaclonal. Las variedades que presentaron mayor variación genética fueron las tetraploides FHIA-17 y FHIA-03 con un 43.38% y 42.48% de polimorfismo respectivamente. La variedad que presentó mayor estabilidad genética fue la única triploide FHIA-25 con un 19.13%.
6. En el análisis de agrupamiento por similitud genética representado en el dendrograma se demuestra una estrecha relación genética entre los individuos dentro de cada variedad y las variedades tetraploides en general presentan mayor similitud entre si que con la única variedad triploide. Sin embargo sólo dos muestras de las 35 analizadas (5.71%) se detectaron como clones dado que presentaron un 100% de similitud genética.

VIII. RECOMENDACIONES

Este tipo de trabajo requiere de estudios complementarios como son las evaluaciones agronómicas, por lo que es recomendable realizar algún tipo de estudio u observaciones tanto durante la aclimatación, (toma de datos), como durante la plantación en el campo de estas variedades que presentaron variación somaclonal, principalmente en las variedades FHIA-03 y FHIA-17 en las que se observó menor estabilidad genética, para detectar posibles diferencias morfológicas o de pérdida de sus propiedades de resistencia o agronómicas principalmente.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Aagaard J.E.;** Wollmer, S.S.; Sorensen, F. C. and Strauss, S. H. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas fir. *Mol Ecol* 4 : 441-447 p.
- 2. Alberts, B.;** Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Robets, K. and Watson, J. 1996. *Biología Molecular de La Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega. España. 1386 p.
- 3. Al-Zahim, M. A.;** Ford-Lloyd, B. V. and Newbury, H. J.. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep- 18*: 473-477 p.
- 4. Anastassopoulos, E.,** and Keil, M. 1996. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplifier polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphatica* 90 : 235-244 p.
- 5. Apostol, B.L.;** Black, W. C.; Reiter, P. and Miller, B. R. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: The breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*. 76: 325-334 p.
- 6. Arnholdt-Schmitt, B.** 2000. RAPD analysis: A method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. *Theor. Appl. Genet.* 100: 906-911 p.
- 7. Balbás, P.** 2002. *De la Biología Molecular a la Biotecnología*. Editorial Trillas. México D. F. 324 p.
- 8. Bogani, P.;** Simoni, A.; Lio', P.; Scialpi, A. and Buiatti, M. 1996. Genome flux in tomato cell clones cultured *in vitro* in different physiological equilibria: A RAPD analysis of variability. *Genome*. 39:846-853 p.
- 9. Bouman, H.** and Kuijpers, A. M. 1994. RAPD patterns and somaclonal variation in Begonin. In *Abst. 4th Int. Congr. Plant. Mol. Biol., Amsterdam*. Poster 37.
- 10. Brown, P.T.H.;** Lange, F. D.; Kranz, E. and Lörz, H. 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plant by PCR and RAPD technology. *Mol. Gen. Genet.* 237: 311-317 p.
- 11. Compton, M. E.** and Veilleux, R. E. 1991. Variation for genetic recombination among tomato plants regenerated from three tissue culture systems. *Genome*. 34: 810-817 p.
- 12. Crouch, H, K.;** Constandt, H.; Van Gysel, A.; Bryne, P.; Van Montagu, M.; Janet, R L. and Ortiz, R. 1999. Comparison of PCR-based molecular marker analysis of *Musa* breeding population. *Molecular Breeding*. 5: 233-244 p.
- 13. Curtis, H.** 2000. *Biología*. 6^{ta} Edición. Editorial Medina Panamericana. 1491 p.
- 14. Díaz, Verónica.** 2001. Caracterización de la Diversidad Genética de Poblaciones Naturales de *Pinus Oocarpa* de Nicaragua a través de Marcadores Moleculares. Tesis Ph.D. Alcalá de Henares, España. Universidad de Alcalá de Henares. 127 p
- 15. Dieffenbach, C.** and Dveksler, G. 1995. *PCR primer: A laboratory manual*. CSHL press. s.l. 714 p.
- 16. Fauré, S.;** Noyer, J. L.; Bakry, F.; Lanaud, C. and González de León, D. 1993. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). *Theor. Appl. Genet.* 87 :517-526 p.
- 17. Ferreira, M.** and Grattapaglia, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2 ed. EMBRAPA-CENARGEN. s.l. 220 p.
- 18. Fontdevilla, A.** y Moya, A. 1999. *Introducción a la Genética de Poblaciones*. Editorial Síntesis S. A. Madrid, España. 349 p.

- 19.Fourré, J. L.;** Berger, P. ; Niquet, L. and André. P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce : morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor.Appl.Genet.* 94 :159-169 p.
- 20.Gauer, L.** and Cavalli-Molina, S. 2000. Genetic Variation in Natural Populations of Maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill; Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity.* 84: 647-656 p.
- 21.Gawel, N. J;** Jarret, R. L. 1991. A Modified CTAB DNA Extraction Procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 93: 262-266 p.
- 22.Goto, S.;** Thakur, R. C. and Ishii, K. 1998. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl using RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 18: 193-197 p.
- 23.Gower, S.** 1995. Bananas and Plantains. INIBAP. Great Britain. Pag 4-6.
- 24.Gupta, P.K.;** Varshney, R. K.; Sharma, P. C. and Ramesh, B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Pl. Breed.* 118: pp. 369-390 p.
- 25.Hashmi, G.;** Huettel, R.; Meyer, R. and Krusberg, L. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep.* 16: 624-627 p.
- 26.Hoelzel, A.** 1998. Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach. 2nd Edition. TRL Press, Department of Biological Sciences, University Of Durham, U.S.A. 445p.
- 27.Hu, J.** and Quiros, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports.* 10: 505-511 p.
- 28.Huertas, M.** comp. 2004. Técnicas en Biotecnología. CNU. León, Nicaragua. 2 v. s.p.
- 29.INIA** (Instituto de Investigación Agropecuaria).Chile 2005. Cultivo de Tejidos: Investigación y Desarrollo (en línea) Consultado 23 agosto 2005. Disponible en http://www.inia.cl/Biotecnología/c_tejidos.htm
- 30.INTA** (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 1997. Guía Tecnológica 16. Managua, Nicaragua.
- 31.Isabel, N.;** Beaulieu, J. and Bousquet, J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and Random Amplified Polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6369-6373 p.
- 32.Karp, A.** and Edward, K. J. 1997. Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. *Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources.* Report of an IPGRI workshop. Rome, Italy. 11-22 p.
- 33.Larkin, P. J.** and Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214 p.
- 34.Lindsey, K.** 1989. Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia, S. A. España. 276 p.
- 35.Lynch, M.** and Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99 p.
- 36.Martínez, C, P;** and Thome, J. 2001. Progresses In The Genetic Improvement Supported By Molecular Markers. (Centro Internacional De Agricultura Tropical, Proyecto Arroz y Unidad De Biotecnología.Cali,Colombia). IV Encuentro Latinoamericano De Biotecnología Vegetal. s.p.
- 37.Mathews, C.K.** and Van Holde, K.E. 1998. Bioquímica. Segunda Edición. Editorial Mcgraw-Hill/Interamericana. España. 1283 p.
- 38.Müller, E. ;** Brown, H. T.; Hartke, S. and Lorz, H. 1990. DNA variation in tissue-culture derived rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 80: 673-679 p.

- 39. Navarro, W.** 1996. Técnica *in vitro* para la producción y mejoramiento de las plantas. Segunda Edición. Editorial de la Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 104 p.
- 40. Nayak, S.; Debata, B. K.; Srivastava, V. K. and Sangwan, N. K.** 2003. Evaluation of agronomically useful somaclonal variants in Jamrosa (a hybrid cymbopogon) and detection of genetic changes through RAPD. *Plant Science*. 164: 1029-1035 p.
- 41. Pancholi, N.; Wetten, A. and Caligari, P. D.** 1996. Detection of levels of somaclonal variation in *Musa* using molecular markers. Meeting on tropical plants. France. s.p.
- 42. Pawlicki, N., Sangwan, R. S. and Sangwannorreel, B. S.** 1993. Somaclonal variation in carotene content of carrot (*Daucus carota* L.) . *Acta Bot. Gallica*. 140:17-22 p.
- 43. Polanco, C. and Ruíz, M.** 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science*. 162: 817-824 p.
- 44. Potter, R., and Jones, M.G.K.** 1991. An assessment of genetic stability of potato *in vitro* by molecular and phenotypic analysis. *Plant Sci*. 76:239-248 p.
- 45. Puertas, M. J.** 1999. Genética: Fundamentos y Perspectivas. 2^{da} Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. España. 913 p.
- 46. Rafalski, J. A. and Tingley, S. V.** 1993. Genetic Diagnostic in Plant Breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genetics*. 9: 275-280 p.
- 47. Rani, V.; Parida, A. and Raina, S, N.** 1995. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Rep*. 14: 459-462 p.
- 48. Riesberg, L.** 1996. Homology among RAPD Fragments in interespecific comparisons. *Mol. Ecol*. 5: 99-105 p.
- 49. Roca, W y Ramírez; H.** 1999. Introducción a la biotecnología vegetal: Curso de mejoramiento molecular de plantas. CIAT, 29 p.
- 50. Rohlf, F.J.** 1993. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80. Exeter Sofmare. New York
- 51. Salazar, E; y col.** 2002. Caracterización De Plantas De Banano (*Musa* AAA) Con Dimorfismo Foliar Mediante El Uso De RAPD'S. Centro Nacional De Investigaciones Agropecuaria (CENIAP), Unidad De Biotecnología. Maracay, Venezuela. s.p.
- 52. Schierwater, B.** 1995. Arbitrarily amplified DNA in systematics and phylogenetics. *Electrophoresis*. 16: 1643-1647 p.
- 53. Solomon, E.; Martin, D.; Berg, L.; y Ville, C.** 1998. Biología. Cuarta Edición. Editorial Interamericana. México, D.F. 1035 p.
- 54. Soto, M.** 1995. Bananos: Cultivo y Comercialización. Litografía e Imprenta LIL, S. A. Costa Rica. s.p.
- 55. Spooner, D.; Treuren, R van. and Vicente, M. C. de.** Molecular Markers for genebank management. IPGRI. Rome, Italy. 126 p. (Technical bulletin No. 10).
- 56. Surzycki, E.** s.f. Agarose Gel Electrophoresis of DNA. s. p.
- 57. Tingey, S. V and del Tufo, J. P.** 1993. Genetic Análisis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiol*. 101:352-394 p.
- 58. UNAN-León.** 2004. Proyecto Musaceas arriba a su tercer año. Gaceta Universitaria. s.p. (No1)
- 59. UNAN-León.** s. f. Musálogo: Catálogo de Germoplasma de *Musa*. Proyecto Musaceae. Dpto de Biología. Facultad de Ciencias. UNAN-León. s.p.

- 60. Veilleux, R. E.** and Johnson; A.A.T. 1998. Somaclonal variation : Molecular Analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breeding Reviews*. 16 : 229-268 p.
- 61. Vidal, M** and García, E. 2000. Analysis of a *Musa sp.* Somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka. *Plant Molecular Biology Reporter*. 18 :23-31 p.
- 62. Williams, J. G;** Kubelik, K.; Livak, A. R.; Rafalski, K. J and Tingey, J. A. 1990. DNA Polymorphisms Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22):6531-6535 p.
- 63. Yang, H.;** Tabei, Y.; Kamad, H.; Rayano, T. and Takawa, F. 1999. Detection of somaclonal variation in cultured rice cell using digoxigenin-based Random Amplified Polymorphic DNA. *Plant Cell*. 8: 520-526 p.

X. ANEXOS

Tabla 1. Variedades de *Musa* encontradas en Nicaragua (INTA, 1997 y UNAN-León, s.f.)

Variedades y/o clones	Genotipo
-----------------------	----------

Guineo	ABB
Cuadrado Criollo	ABB
Cuadrado Enano	ABB
Pelipita	ABB
Manzano	ABB
Banano	AAA
FHIA-25	AAB
Gros Michel (Patriota Caraceño)	AAA
Caribe Amarillo	AAA
Caribe Rojo	AAA
Grupo Cavendish	AAA
Valery ó Robusta	AAA
Giant Cavendish (Enano Gigante)	AAA
Dwarf Cavendish (Enano miel)	AAA
Plátanos	AAB
Harton (Plátano Criollo)	AAB
Dominico	AAB
Plátano Enano	AAB
Tetraploides	
FHIA-03	AABB
FHIA-01	AAAB
FHIA-17	AAAA
PHIA-20	AAAB
FHIA-21	AAAB

Tabla 7. Matriz presencia-ausencia de Marcadores RAPDs, detectados con 11 cebadores para 35 de muestras de un total de 5 variedades (7 muestras por variedad) de *Musa sp.*

No	Código /Variedad	Marcadores RAPDs/cebador																						
		P-O8				I-09				I-06				B-05										
1	FHIA-01 (1)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	
2	FHIA-01 (2)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
3	FHIA-01 (3)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
4	FHIA-01 (4)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5	FHIA-01 (5)	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
6	FHIA-01 (6)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
7	FHIA-01 (7)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
8	FHIA-03 (1)	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
9	FHIA-03 (2)	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
10	FHIA-03 (3)	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
11	FHIA-03 (4)	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
12	FHIA-03 (5)	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
13	FHIA-03 (6)	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
14	FHIA-03 (7)	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
15	FHIA-17 (1)	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
16	FHIA-17 (2)	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
17	FHIA-17 (3)	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
18	FHIA-17 (4)	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
19	FHIA-17 (5)	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
20	FHIA-17 (6)	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
21	FHIA-17 (7)	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
22	FHIA-20 (1)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
23	FHIA-20 (2)	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
24	FHIA-20 (3)	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
25	FHIA-20 (4)	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
26	FHIA-20 (5)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
27	FHIA-20 (6)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
28	FHIA-20 (7)	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
29	FHIA-25 (1)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
30	FHIA-25 (2)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
31	FHIA-25 (3)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
32	FHIA-25 (4)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
33	FHIA-25 (5)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
34	FHIA-25 (6)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
35	FHIA-25 (7)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1

Tabla 7. Continuación

No	Código /Variedad	Marcadores RAPDs/cebadores																								
		S-07					N-09					A-04					H-07									
1	FHIA-01 (1)	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
2	FHIA-01 (2)	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
3	FHIA-01 (3)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	
4	FHIA-01 (4)	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	
5	FHIA-01 (5)	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
6	FHIA-01 (6)	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
7	FHIA-01 (7)	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	
8	FHIA-03 (1)	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	
9	FHIA-03 (2)	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
10	FHIA-03 (3)	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	
11	FHIA-03 (4)	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	
12	FHIA-03 (5)	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
13	FHIA-03 (6)	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	
14	FHIA-03 (7)	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
15	FHIA-17 (1)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	
16	FHIA-17 (2)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
17	FHIA-17 (3)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
18	FHIA-17 (4)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	
19	FHIA-17 (5)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	
20	FHIA-17 (6)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	
21	FHIA-17 (7)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	
22	FHIA-20 (1)	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	
23	FHIA-20 (2)	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
24	FHIA-20 (3)	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
25	FHIA-20 (4)	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
26	FHIA-20 (5)	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
27	FHIA-20 (6)	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	
28	FHIA-20 (7)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	
29	FHIA-25 (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
30	FHIA-25 (2)	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
31	FHIA-25 (3)	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
32	FHIA-25 (4)	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
33	FHIA-25 (5)	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
34	FHIA-25 (6)	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
35	FHIA-25 (7)	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	

Tabla 7. Continuación

No	Código /Variedad	Marcadores RAPDs/cebador																		
		D-07					B-10					G-05								
1	FHIA-01 (1)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
2	FHIA-01 (2)	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
3	FHIA-01 (3)	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
4	FHIA-01 (4)	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
5	FHIA-01 (5)	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
6	FHIA-01 (6)	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
7	FHIA-01 (7)	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
8	FHIA-03 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
9	FHIA-03 (2)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
10	FHIA-03 (3)	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
11	FHIA-03 (4)	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
12	FHIA-03 (5)	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
13	FHIA-03 (6)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
14	FHIA-03 (7)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
15	FHIA-17 (1)	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
16	FHIA-17 (2)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
17	FHIA-17 (3)	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
18	FHIA-17 (4)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
19	FHIA-17 (5)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
20	FHIA-17 (6)	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
21	FHIA-17 (7)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
22	FHIA-20 (1)	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
23	FHIA-20 (2)	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
24	FHIA-20 (3)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
25	FHIA-20 (4)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
26	FHIA-20 (5)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
27	FHIA-20 (6)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
28	FHIA-20 (7)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
29	FHIA-25 (1)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
30	FHIA-25 (2)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
31	FHIA-25 (3)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
32	FHIA-25 (4)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
33	FHIA-25 (5)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
34	FHIA-25 (6)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
35	FHIA-25 (7)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

Foto 1. Material proporcionado por el laboratorio de tejido de cultivo de la UNAN-León



Foto 3. Cebador P-08 con variedad PHIA-25 (Pozo 1 marcador molecular, Pozos 2-5 individuos 1 a 7)

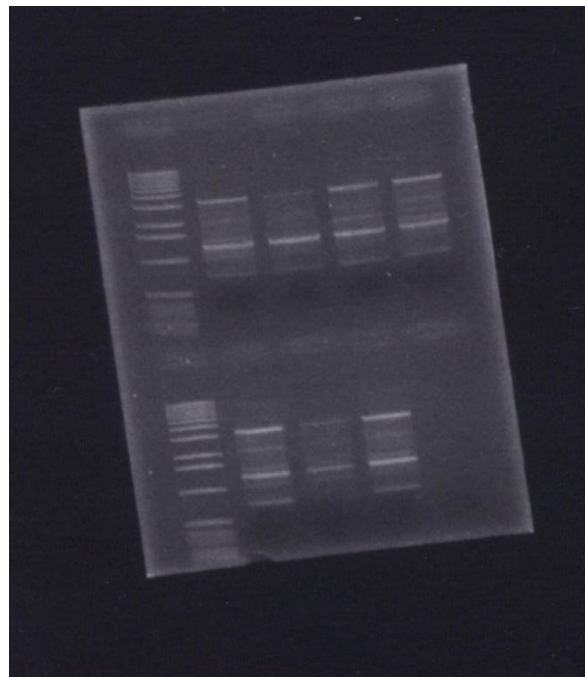


Foto 4. Cebador B-10 con variedad PHIA-17 (Pozo 1 marcador molecular, Pozos 2-5 individuos 1 a 7)

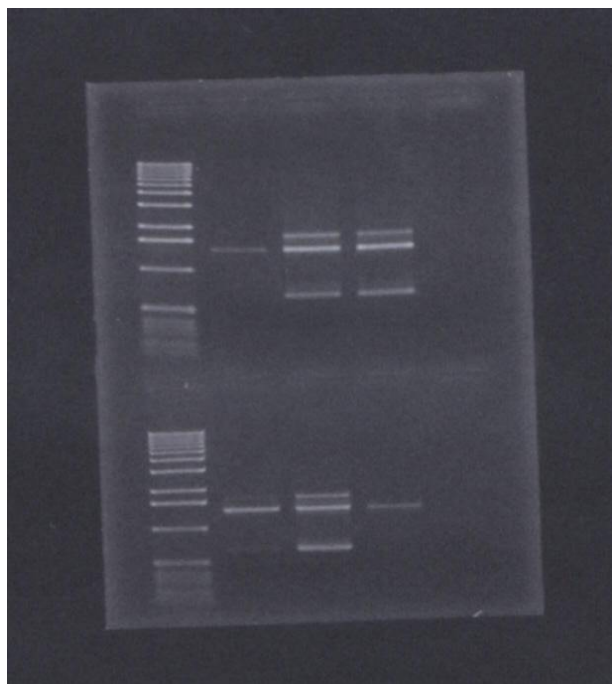


Foto 5. Cebador G-05 con variedad PHIA-20 (Pozo 1 marcador molecular, Pozos 2-5 individuos 1 a 7)

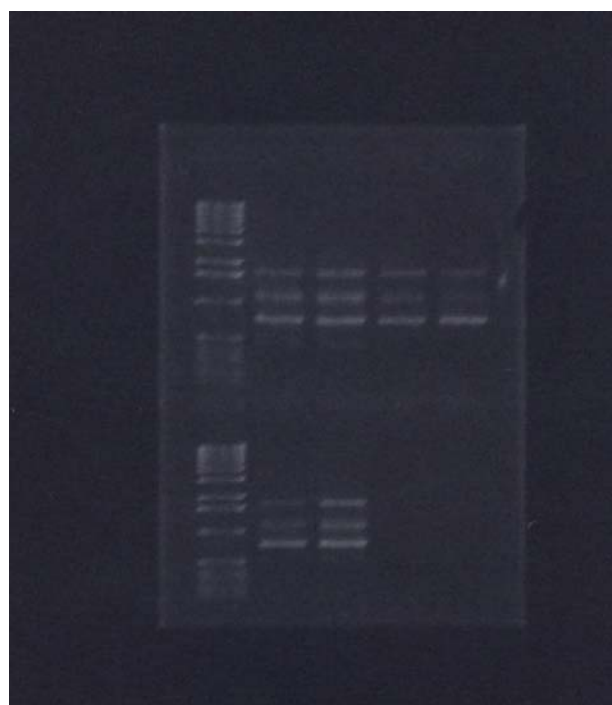
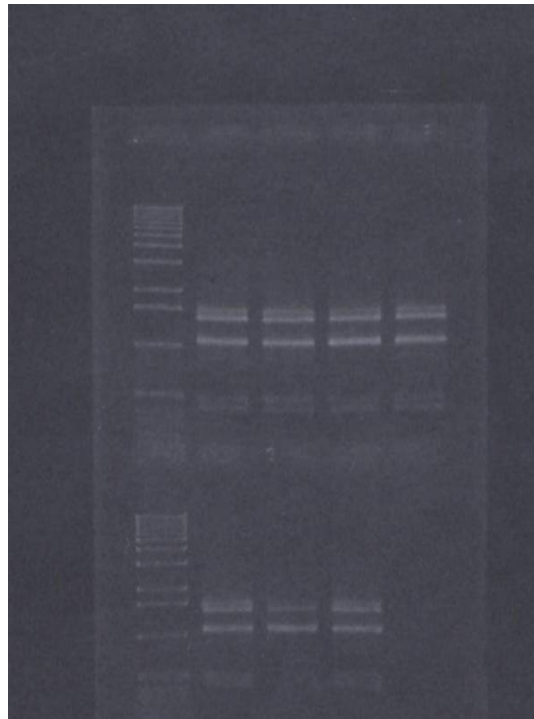
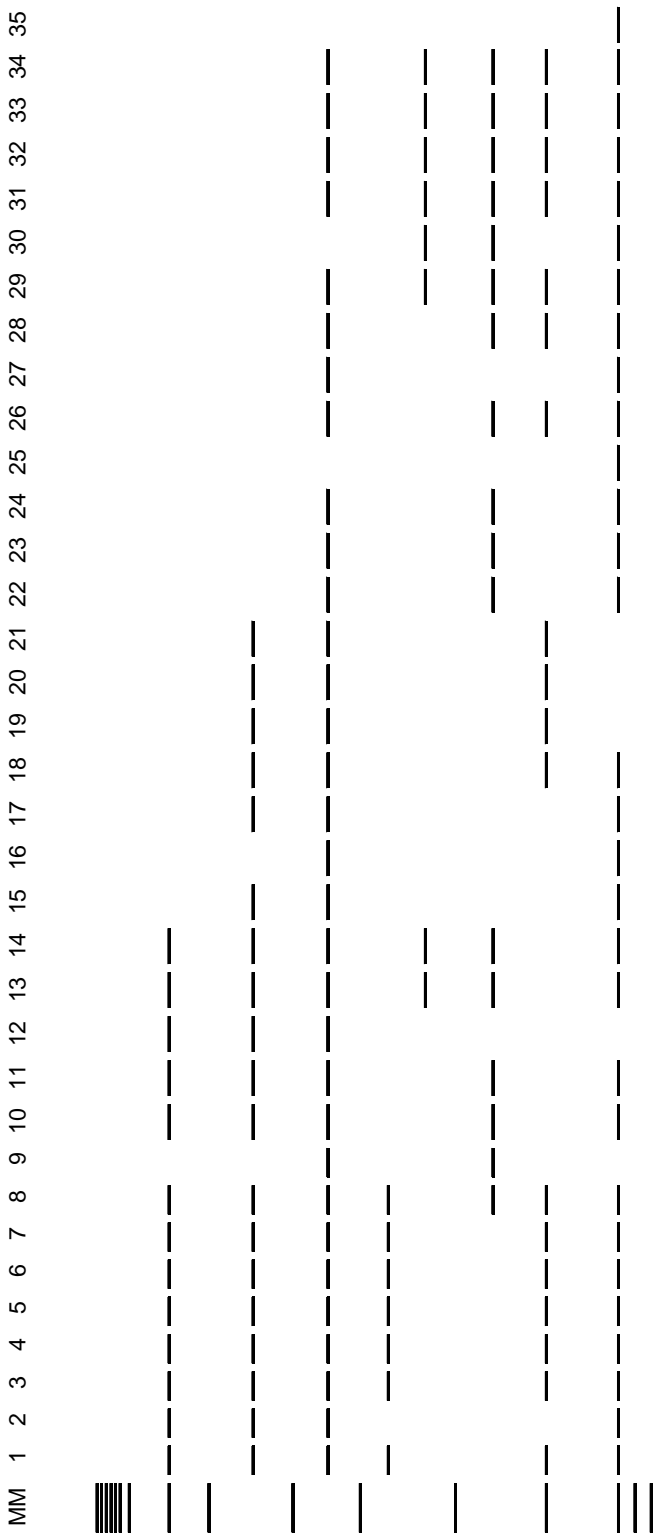


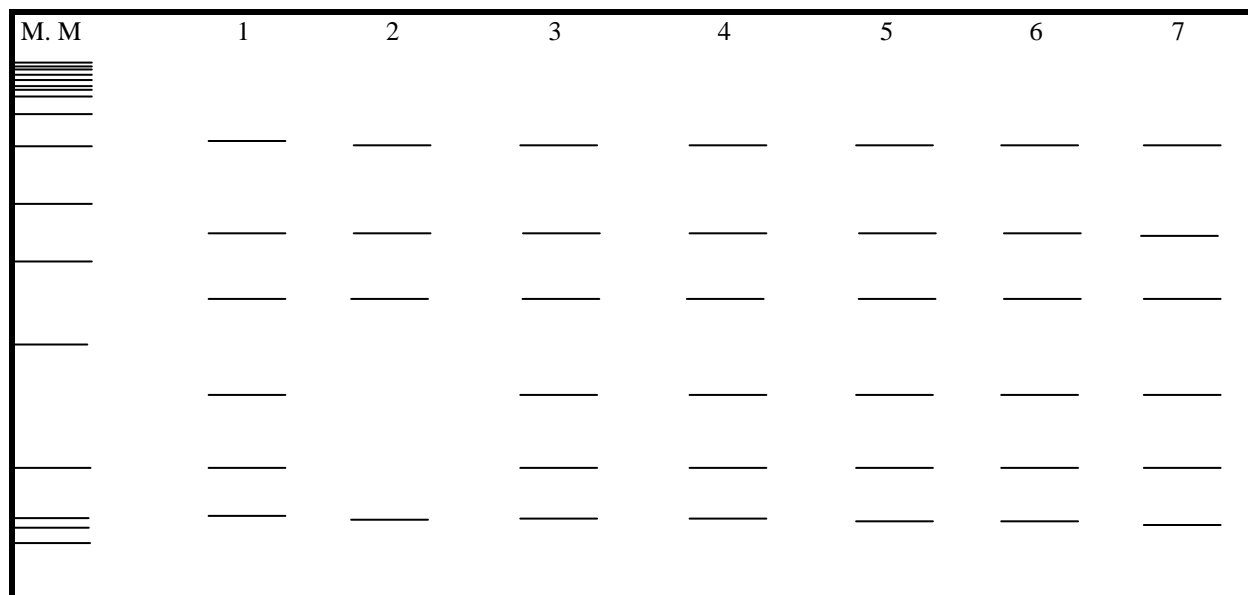
Foto 6. Cebador B-05 con variedad PHIA-03 (Pozo 1 marcador molecular, Pozos 2-5 individuos 1 a 7)



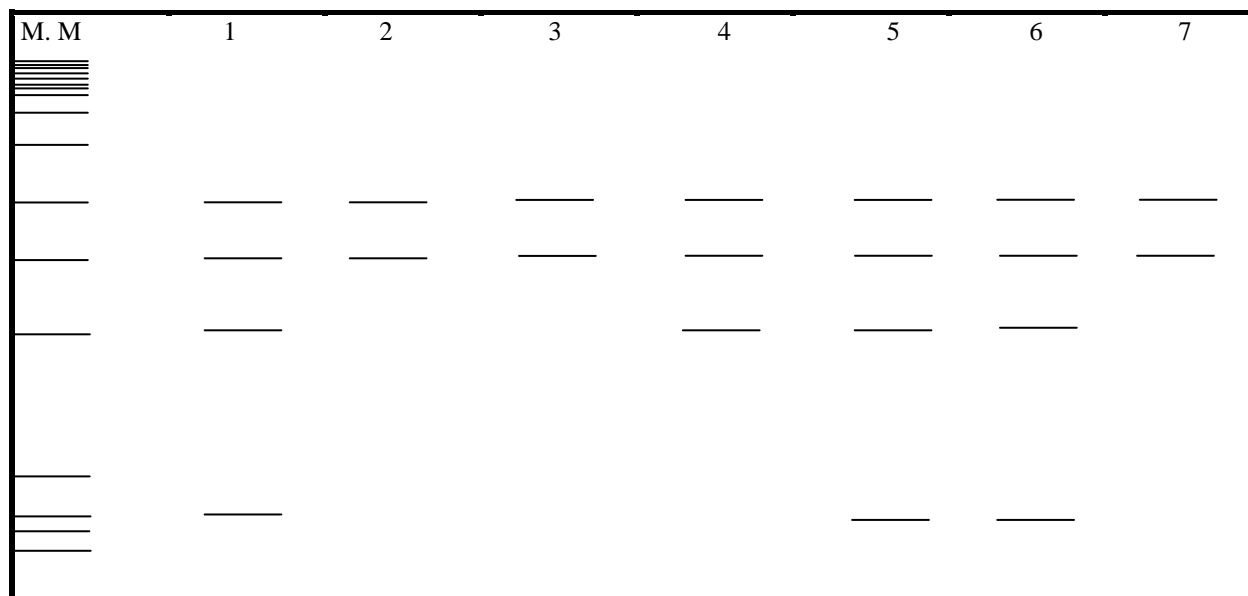
Esquema 1. Patrón de bandas para cebador H-07 con todas las variedades



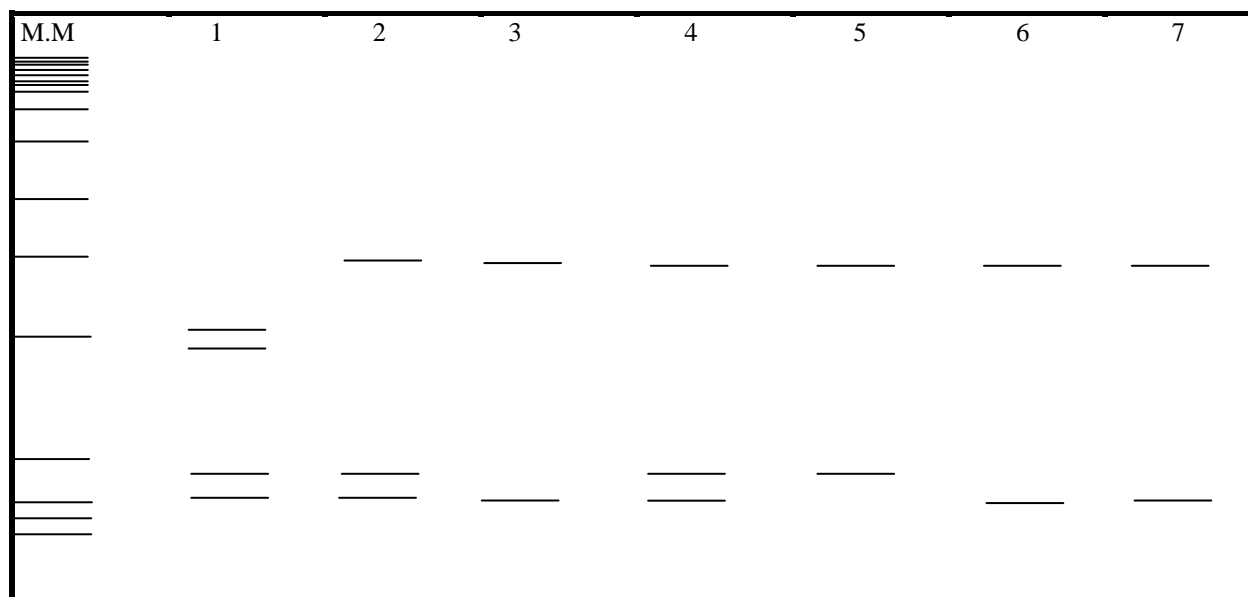
Esquema 2. Patrón de bandas para cebador H-07 con variedad FHIA-01



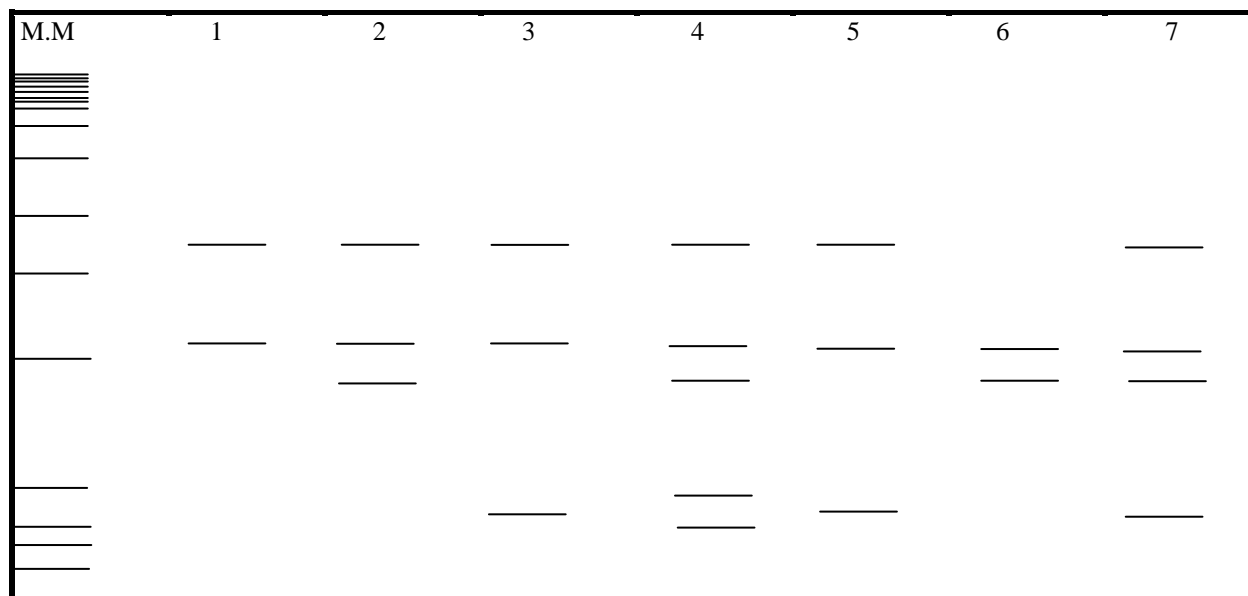
Esquema 3. Patrón de bandas para cebador A-04 con variedad FHIA-01



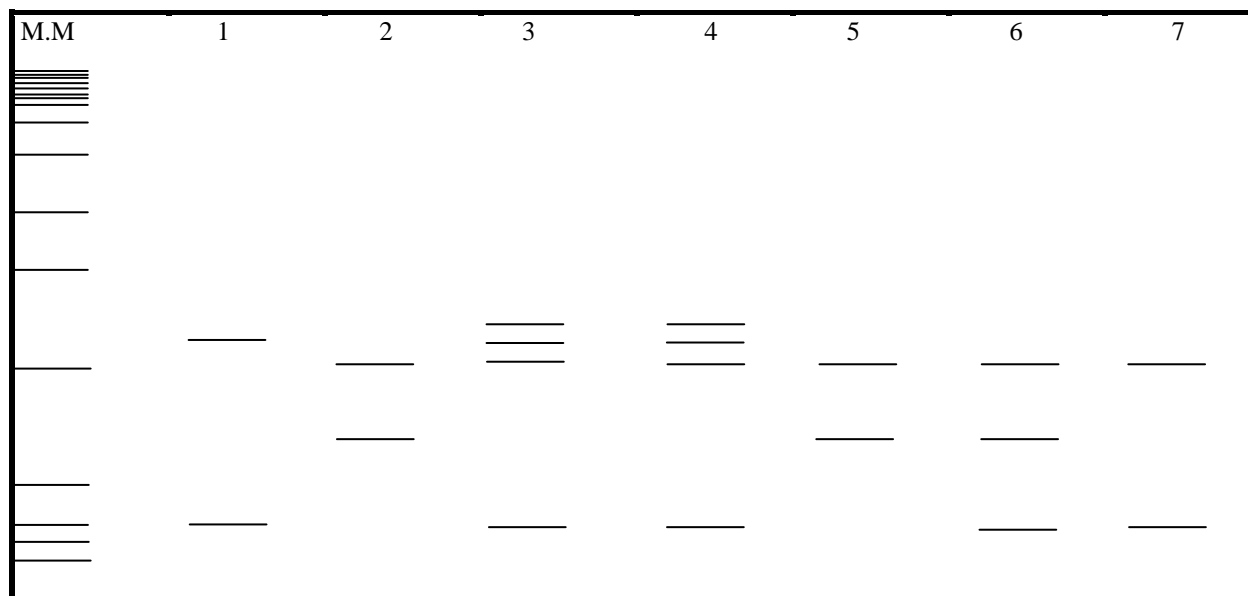
Esquema 4. Patrón de banda para cebador S-07 con variedad FHIA-03



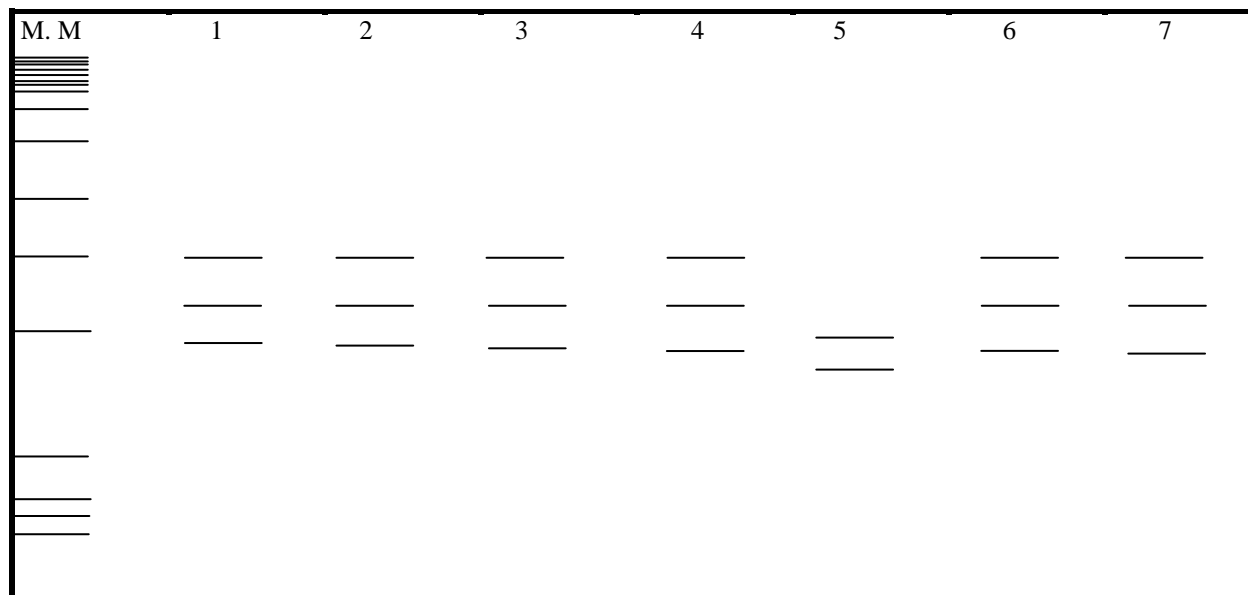
Esquema 5. Patrón de banda para cebador N-09 con variedad FHIA-03



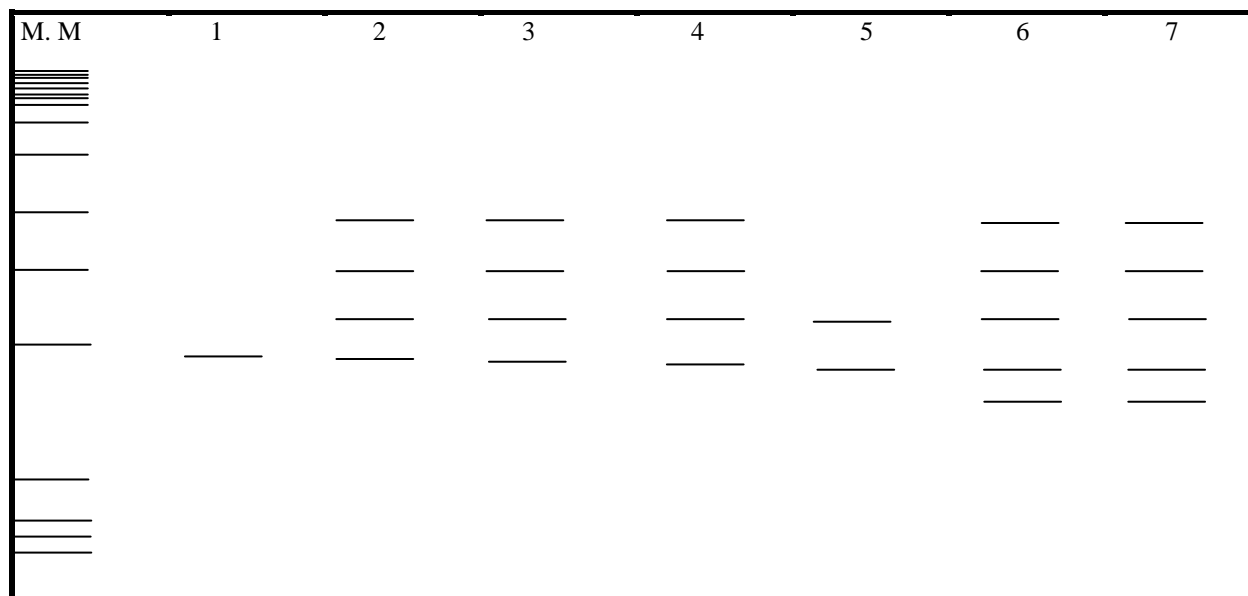
Esquema 6. Patrón de bandas con cebador D-07 con variedad FHIA-03



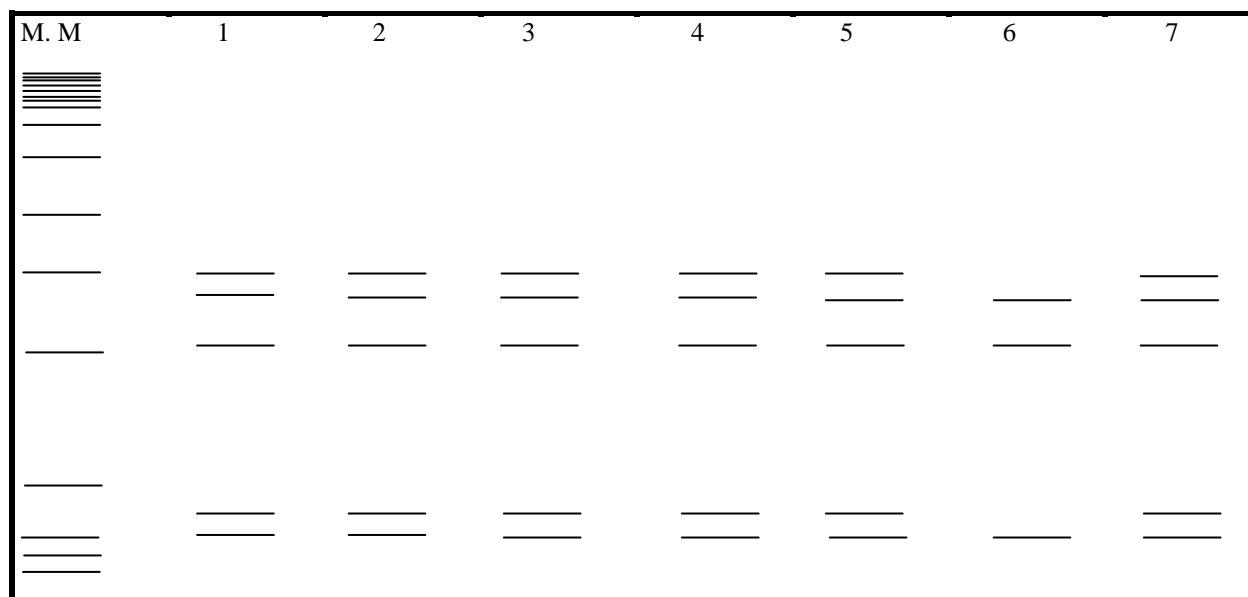
Esquema 7. Patrón de bandas para cebador I-09 con variedad FHIA-17



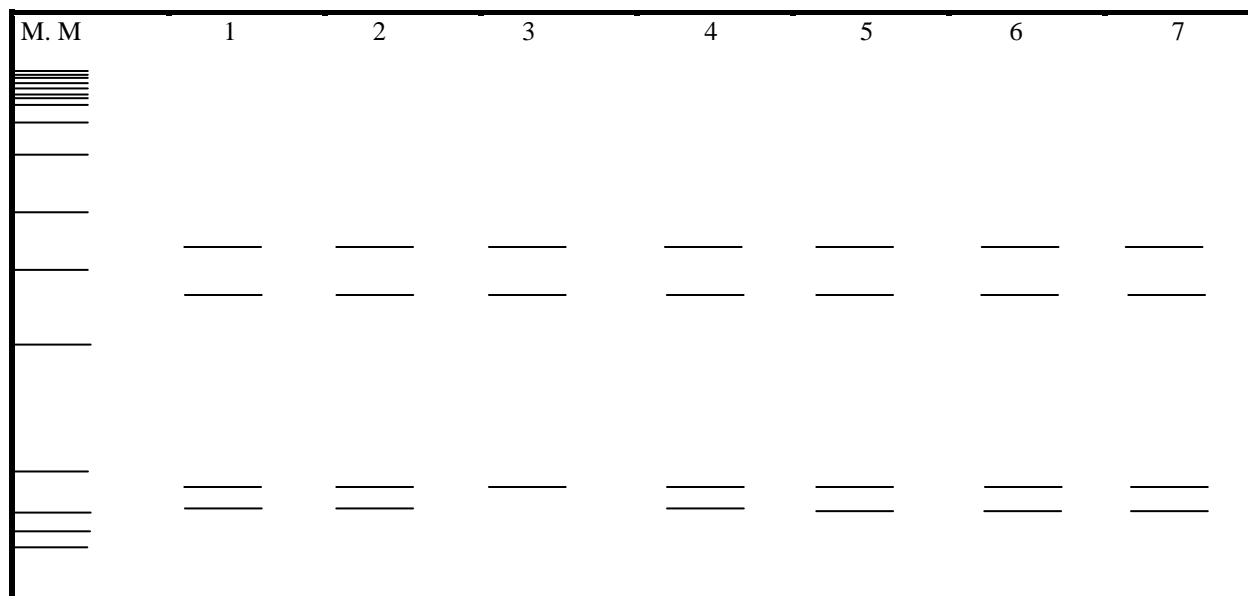
Esquema 8. Patrón de bandas para cebador I-06 con variedad FHIA-17



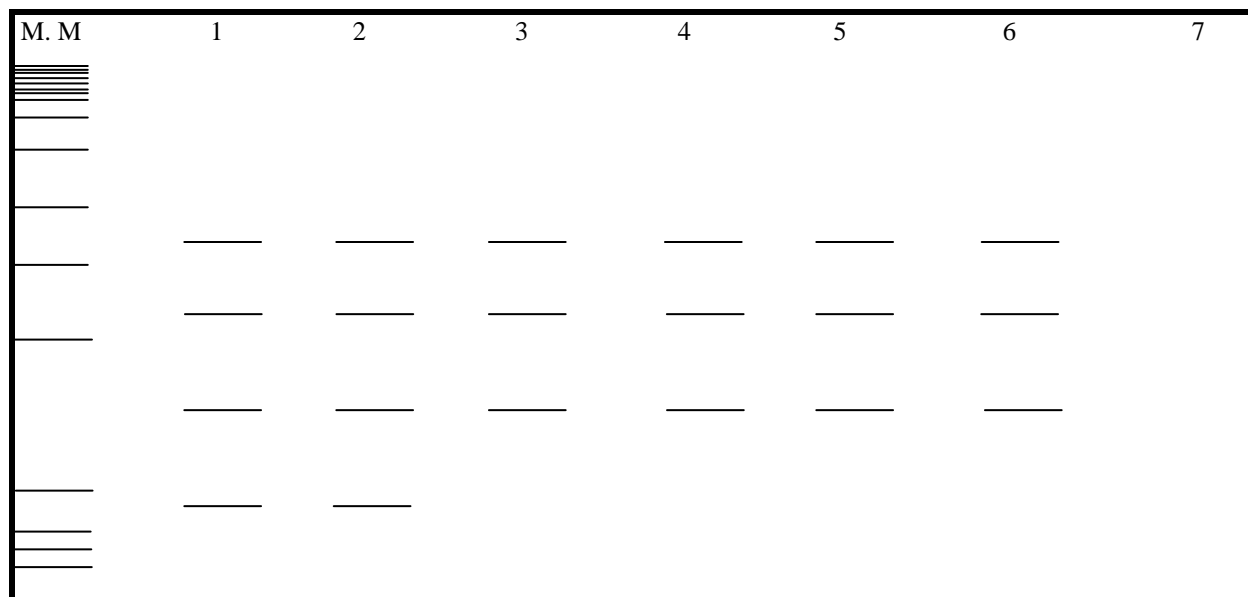
Esquema 9. Patrón de bandas para cebador B-05 con variedad FHIA-01



Esquema 10. Patrón de bandas para cebador B-10 con variedad FHIA-25



Esquema 11. Patrón de bandas para cebador G-05 con variedad FHIA-20



Esquema 12. Patrón de bandas para cebador P-08 con variedad FHIA-25

