



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**TESIS DE GRADO PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

TEMA:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE PLÁTANO
(*Musa* AAB) CVS. “DOMINICO” Y “BARRAGANETE” UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES RAPD’S”

AUTORA:

MARÍA EUGENIA ROMERO ROMÁN

DIRECTOR DE TESIS:

ING. AGR. GONZALO ALMAGRO MAYORGA

GUAYAQUIL – ECUADOR

2011



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

La presente tesis de grado titulada “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE PLÁTANO (Musa AAB) CVS. “DOMINICO” Y “BARRAGANETE” UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD’S”; realizada por la Egda. María Eugenia Romero Román, bajo la dirección del Ing. Agr. Gonzalo Almagro Mayorga; ha sido aprobada y aceptada por el Tribunal de Sustentación como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERA AGRÓNOMA

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Agr. Francisco Andrade España
Presidente

Ing. Agr. M.Sc. Gonzalo Almagro Mayorga
Examinador Principal
Director de Tesis

Ing. Agr. M.Sc. Leticia Vivas Vivas
Examinadora Principal

DEDICATORIA

A Dios, dueño de lo que tengo y soy; creador y guía de mi vida, quien a través del Espíritu Santo me dio ciencia, sabiduría y fortaleza para cumplir con mi trabajo.

Al Dr. Manuel Humberto Romero Aguirre, excelente padre, amigo, mi orgullo y ejemplo, quien con devoción, amor y principios llenó mi vida y ahora desde el Cielo me cuida.

A la Ing. Sonia María Román, la expresión del amor infinito de Dios hecha madre, en reconocimiento a su esfuerzo, entrega total, dedicación y amor; al cuidarme, formarme y hacerme la mujer que soy.

A mi abuelita Hilda, mi viejita preciosa quien veló por mí en mis primeros años y aportó incondicionalmente en mi educación.

A mis tíos y tías especialmente Patricio por todo lo que es y hace por mí.

A mi hermanos María Olivia, mi mejor amiga, a Manuel Alejandro el reemplazo de papá y María Cristina pedacito de mi corazón y la razón para seguir luchando.

“No recuerdo todo lo que siento pero si siento todo lo que recuerdo”

AGRADECIMIENTO

La autora manifiesta su gratitud sincera a la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias, profesores, personal administrativo y de servicios quienes de una u otra forma cooperaron en la formación profesional de la ejecutante.

Al Programa de Banano, Plátano y otras Musáceas y al Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja” y al Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP.

Un reconocimiento especial al Ing. Agr. M.Sc. PhD. Walter Oswaldo Reyes Borja, Responsable del Laboratorio de Biotecnología, Director de la presente Tesis, y del Proyecto mediante el cual se desarrolló la presente investigación; por su apoyo, consejos, motivación y ayuda.

Al Biol. M.Sc. PhD. Eduardo Morillo, Director Nacional de Biotecnología de INIAP; al Ing. M.Sc. PhD. José Enrique Nieto Rodríguez de la Unidad de Investigación Científica y Tecnología de la UTEQ, a la Dra. Lizandra Catelli investigadora de EMBRAPA, a la Ing. Gabriela Miño y al Ing. Agr. Roy Flores de INIAP y al Ing. Gonzalo Almagro Mayorga, profesor de la cátedra de Biotecnología de la Universidad de Guayaquil; por su tiempo, colaboración y conocimientos.

A los ingenieros Diego Portalanza y Elena Corozo, a mis compañeros de Laboratorio Biol. Carmen Valladares, egresados Mónica Armas, Lenin Arana, Alex Valarezo y José Andrés Acosta y al pasante Victor Emilio Pincay por brindarme su apoyo. A todos mis amigos, personal técnico y administrativo de la EELS - INIAP que indirectamente ayudaron para la culminación de la Tesis.

Y, gratitud infinita a mi mamá y mis hermanos, por su apoyo, consideración y amor.

Las investigaciones, resultados, conclusiones y recomendaciones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

María Eugenia Romero Román

ma.euge.romero@hotmail.co

ÍNDICE

Contenido	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Objetivos.....	3
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Taxonomía del plátano	4
2.2. Origen, distribución y producción mundial.....	4
2.3. Clones seleccionados por sus características de producción	5
2.4. Mejoramiento y conservación de germoplasma.....	8
2.5. Variabilidad genética.....	10
2.6. Caracterización del germoplasma.....	11
2.6.1. Marcadores morfológicos.....	12
2.6.2. Marcadores moleculares.....	12
2.6.2.1. Marcadores moleculares basados en la PCR	13
2.6.2.1.1. RAPD's.....	14
2.7. Análisis de los datos de la caracterización.....	15
III MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Ubicación geográfica.....	16
3.2. Materiales.....	16
3.2.1. Material experimental.....	16
3.2.2. Material de laboratorio, reactivos y equipos.....	16
3.3. Factor en estudio.....	17
3.4. Tratamientos.....	17
3.4.1. Colección de muestras.....	17
3.4.2. Extracción de ADN vegetal.....	17
3.4.3 Cuantificación del ADN genómico.....	18
3.4.4. PCR.....	19

3.4.4.1	Oligonucleótidos	19
3.4.4.2	Selección de oligonucleótidos	19
3.4.4.3.	Cóctel de amplificación o mix.....	20
3.4.4.4.	Amplificación de ADN polimórfico.....	20
3.4.4.5.	Programación del termociclador para la PCR.....	20
3.4.4.6.	Visualización de amplicones y documentación..	21
3.5.	Análisis estadístico.....	21
IV	RESULTADOS.....	23
4.1	Evaluación de protocolos de extracción, cuantificación y validación de ADN.....	23
4.2	Selección de oligonucleótidos y análisis RAPD.....	24
4.3	Genotipaje	24
4.4	Diversidad genética	24
4.5	Análisis de clusters	25
V	DISCUSIÓN.....	31
VI	CONCLUSIONES.....	35
VII	RECOMENDACIONES.....	36
VIII	RESUMEN.....	37
IX	SUMMARY.....	38
X	LITERATURA CITADA.....	39
	ANEXOS	47

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Condiciones de amplificación de la PCR (Onguso et al., 2003)	20
Cuadro 2. Reactivos para preparación de mix PCR.	21
Cuadro 3. Condiciones de amplificación de la PCR. Morillo y Miño (2010)	23
Cuadro 4 Determinación del porcentaje de polimorfismo de oligonucleótidos seleccionados para el análisis RAPD	24
Cuadro 5. Determinación del porcentaje de polimorfismo de iniciadores seleccionados para el análisis de Dominico	
Cuadro 5. Índices de diversidad genética de plátano “Dominico”	26
Cuadro 6. Índices de diversidad genética de “Barraganete”	26

Índice de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Peso promedio de racimos de plátano “Barraganete”	15
2	Peso promedio de racimos de plátano “Barraganete” (Banco de Germoplasma)	15
3	Peso promedio de pesos de racimo de plátano “Dominico” de una finca del cantón Playones	16
4	Promedio de pesos de racimo de plátano “Dominico” del Banco de Germoplasma	16
5	Rendimiento del ADN de las 80 accesiones de plátano “Dominico” cuantificado por fluorimetría.	24
6	Rendimiento del ADN de las accesiones de plátano “Barraganete” cuantificado por fluorimetría	24
7	Dendrograma de accesiones de plátano “Barraganete” en base a datos RAPD (método UPGMA y coeficiente de asociación de Jaccard)	27
8	Dendrograma de accesiones de plátano “Dominico” en base a datos RAPD (método UPGMA y coeficiente de Nei y Li)	28
9	Dendrograma plátano “Dominico” por localidades con el método UPGMA y el coeficiente de Nei standard.	29
10	Resultado del análisis de coancestrías con enfoque Bayesiano para las muestras de “Dominico” (A) y “Barraganete” (B)	30
11	Dispersión de las matrices generadas por reconstrucción y reducción para determinar el límite de confianza	31

- 12 . Dispersión de las matrices generadas por reconstrucción y reducción 31
para determinar el límite de confianza en “Dominico”.

Índice de Anexos

Anexo	Descripción	Página
1	Procedencia de los clones de “Barraganete” del Banco de Germoplasma de la EELS	48
2	Procedencia de los clones de “Dominico” del Banco de Germoplasma de la EELS.	49
3	Croquis del Banco de Germoplasma de la EELS	51
4	Materiales requeridos para la caracterización molecular de plátano “Dominico” y “Barraganete”	52
5	Reactivos necesarios para la caracterización a través de RAPD`s	52
6	Equipos de Laboratorio	52
7	Protocolos de Extracción de ADN	53
8	Test de integridad y cuantificación por comparacion visual de bandas	57
9	Resultados de Cuantificacion por fluorimetría	58
10	Lista de primers RAPD`s y las secuencias respectivas, citados por Nadal, 2009*; Onguso et al., 2003**;Venkatachalam Sreedhar y Bhagyalakshmi 2008***	60
11	Pre selección de 4 primers con 5 individuos (kit Taq INVITROGEN)	60
12	Calculos con reducción de reactivos (Miño, 2010) para Selección de primers con buffer 5x (EMBRAPA 2002) y Taq (Laboratorio de Biotecnología EESC, 2010)	61
13	Selección de iniciadores RAPD`s	61
14	Selección RAPD's (“Dominico”)	62
15	Amplificacion de 40 ADN´s de barraganete con diferentes iniciadores.	63

16	Visualizacion en gele de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación	65
----	--	----

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism”
AUP	Agua Ultra Pura
BrET	Bromuro de Etidio
CIA	Cloroformo – Alcohol Isoamílico
Cl ₂ Mg	Cloruro de Magnesio
CLNa	Cloruro de Sodio
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide (detergente catiónico)
dATP	Deoxyadenosine triphosphate (nucleótido – síntesis DNA)
dCTP	Deoxycytidine triphosphate (nucleótido – síntesis DNA)
dTTP	Deoxythymidine triphosphate (nucleótido – síntesis DNA)
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate (nucleótido – síntesis DNA)
Dntp`s	Desoxiribonucleotidos (dATP, dCTP, dTTP,dGTP)
EDTA	(Acido entilendiaminotetracético)
g.	Gramos
Ha.	Hectárea
Kb	Kilobase
M	Molar
mM	Milimolar
mA	Miliamperios
Ng.	Nanogramo
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pm	Peso molecular
PVP	Polivinil pirolidona (antioxidante)
Qbit	Fluorómetro par a cuantificación
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
Rpm	Revoluciones por minuto
SSR	“Simple Sequence Repeat”
TAE	Tricetato EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (bacteria termoestable)
TE	Amortiguador tris EDTA
TM.	Toneladas métricas
3`	Átomo 3 del carbono de la desoxiribosa
UV	Ultravioleta
ug.	Microgramo
uL	Microlitro
Vol	Volumen
V	Voltio

I. INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa* AAB) es un cultivo distribuido mundialmente en las regiones tropicales y subtropicales. Es un componente importante para la dieta alimenticia en casi todos los países consumidores, por su alto contenido de vitaminas y minerales, como alimento cocido o como fruta fresca (Morales *et al.*, 2009).

Más de cuatrocientos millones de personas que habitan en los trópicos y subtrópicos dependen del cultivo de las musáceas. Además, significa un ingreso económico relevante para muchos países productores al comercializarse tanto en los mercados locales como en los mercados de exportación (Canales *et al.*, 2004).

En África Occidental y Central, el plátano se siembra asociado con otros cultivos a densidades muy bajas y con rendimientos entre 5 a 10 toneladas por hectárea (INIBAP, 2005). En Ecuador de igual forma, se siembra para dar sombra a los cultivos de café y cacao, en pequeños huertos familiares para la subsistencia y el consumo interno (FAO, 2001), en tales condiciones su producción es de 4 t. (MAG, 2002). No obstante, en los últimos años se ha intensificado el monocultivo con miras a la exportación, especialmente en la zona de El Carmen-Manabí con rendimientos de 14 t. (Jumbo, 2010).

En Ecuador el área platanera está distribuida principalmente en las provincias de Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro. Cubre cerca de 180.000 hectáreas de las cuales 101.258 corresponden al plátano como cultivo asociado (MAG, 2002). El rendimiento promedio es de 1200 cajas de 23,5 kg. por hectárea.

En el país, los cultivares de plátano más sembrados son “Dominico” y “Barraganete” (Tazán, 2003). En las provincias de la costa donde se ha desarrollado el cultivo por décadas, se ha encontrado que cada genotipo sea “Dominico” o “Barraganete”, agrónomicamente se parecen. Sin embargo, dentro de las plantaciones aún creciendo en las mismas condiciones, algunos de ellos responden con altas producciones, observadas a través de racimos de buen peso. No se conoce si este comportamiento es por efecto

ambiental o por la variabilidad genética que podría existir entre los individuos de estos cultivos.

La caracterización agronómica y morfológica son de gran utilidad para seleccionar ciertos especímenes por sus particularidades físicas o de producción, no obstante; estos tipos de selección no descartan las dudas con respecto a la variabilidad; por lo tanto es primordial la caracterización molecular para asistir a la selección de materiales con características de interés genético.

La caracterización molecular se realiza a través de marcadores de alta confiabilidad tales como isoenzimas, RFPL's, RAPD's, microsatélites, AFLP's, entre otros. Estos marcadores han sido aplicados desde su descubrimiento a finales de los 70's (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Claros, 2002 y Amorim *et al.*, 2008) cuyos usos han sido primordialmente para la identificación de genotipos, evaluación de germoplasma, mapeo genético, análisis filogenéticos, etc.

En musáceas se han realizado diversos análisis genéticos aplicando técnicas tales como RAPD's por Onguso *et al.* (2003), Peteira *et al.* (2003) y Nadal *et al.* (2009); SSR por la FHIA (2004) y AFLP's por El-Khishin *et al.* (2009).

Cabe indicar que cada marcador molecular tiene ciertas ventajas y desventajas, no obstante, se escogió RAPD's (Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente) por su costo relativamente bajo comparado con microsatélites y AFLP's, por la sencillez de la tecnología aplicada, su expresión génica dominante, su universalidad y no requiere conocimiento del genoma. Además, es apropiada para la detección de variabilidad genética en bancos de germoplasma (Peteira *et al.*, 2003). De igual forma pueden determinar altos niveles de polimorfismos y los oligonucleótidos están disponibles fácilmente.

A través del uso de marcadores moleculares RAPD's, se hizo la caracterización molecular de clones élite de plátano "Dominico" y "Barraganete". Se escogieron estos subcultivos para ser caracterizados, asumiendo el hecho de que hay variabilidad genética

entre los materiales y aprovechando que existe un Banco de Germoplasma. *ex situ*. Esta investigación se realizó con el apoyo económico del Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur del INIAP.

Los objetivos fueron:

GENERAL

1. Generar información que contribuya a la identificación de genotipos superiores de plátano cvs. “Dominico” y “Barraganete”.

ESPECÍFICOS

1. Determinar molecularmente la variabilidad genética de 80 clones de plátano “Dominico” y 40 de “Barraganete” existentes en la colección de la EELS utilizando de marcadores RAPD’s.
2. Identificar grupos genéticamente distintos dentro de las poblaciones de plátano de los dos cvs. “Dominico” y “Barraganete”.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Taxonomía del plátano

Según Champion (1968) la clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase:	Monocotiledóneas
Orden:	Escitamineas
Familia:	Musaceae
Subfamilia:	Musoideae
Género:	Musa
Especies:	Acuminata y Balbisiana
Sección:	Eumusa

Parra, Cayon y Polania (2009), refiriéndose a lo descrito por Simmonds (1966); Benalcázar (1991) y Sierra (1993) confirman que la mayoría de cultivares de plátano y banano de la familia *Musaceae* tienen origen en dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla y *M. balbisiana* Colla que por poliploidía e hibridación generaron las variedades cultivadas. Las composiciones ploidales y genómicas de los diferentes clones representan a *M. acuminata* y *M. balbisiana*, como A y B respectivamente.

Tanto el banano y como el plátano tienen 11 cromosomas. El plátano AAB al ser un híbrido triploide tiene una ploidía $3n=33$. Su genoma posiblemente tendrá 500.000 a 600.000 pb (uno de los más pequeños); según lo premonizan algunos científicos del Consorcio Genómico Global Musa (BBC, 2001).

Los híbridos diploides y triploides de banano y plátano son el producto de dos procesos evolutivos acompañados de la domesticación; por ello, sus frutos se muestran partenocárpicos y estériles. Su multiplicación se hace de manera vegetativa asegurando la conservación de fenotipos relativamente sin cambios (González de León, 1992).

La esterilidad en la mayoría de los plátanos puede estar determinada por la presencia de genes de esterilidad femenina y/o cambios numéricos o estructurales de los cromosomas, así como por su ploidía (Soto, 1985 citado por Román, Alonso y Barrios 1997)

2.2. Origen, distribución y producción mundial

El plátano antes conocida como *Musa paradisiaca*, tiene su origen en el Sudeste Asiático y datan su existencia desde los 650 AC. Llegó a las Islas Canarias en el siglo XV y de ahí fue extendido a algunas regiones de América Central y América del Sur (Ortega *et al.*, 2010).

Morales *et al.* (2009) basándose en el reporte de la FAO (2001) acotan que, los cultivos de banano y plátano se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; ubicado en el cuarto renglón en la categoría de productos alimenticios de gran demanda después del arroz, el trigo y la leche.

Se estima que la producción de musáceas a nivel mundial es de aproximadamente 108 millones de toneladas métricas por año, de las cuales el 60% corresponde a banano y el 32% a plátano, siendo los mayores productores India, Ecuador, Brasil y China y en menor escala países tropicales de América, Asia y África. (FHIA, 2004). Por otro lado, Morales *et al.* (2009) señalan que el plátano ocupa un área de 5'457.065 Ha, con una producción aproximada de 35 millones de TM. por año y un rendimiento de 6311.9 kg/Ha.

2.3 Clones seleccionados por sus características de alta producción

Los clones de “Dominico”, se extrajeron de las zonas de Playones, Roberto Astudillo y Marcelino Maridueña y los de “Barraganete” de la zona de El Carmen, Manabí; forman parte del Banco de Germoplasma de la EELS de INIAP y fueron escogidos por sus características de alta producción. A continuación los pesos promedio de

racimos de plantas de producción normal y los promedios de las plantas altamente productivas tanto de “Barraganete” (Figura 1 y 2) .

Asi mismo se observa la diferencia entre un racimo de peso normal y uno de peso superior tomado en un mismo lote (Figura 3).

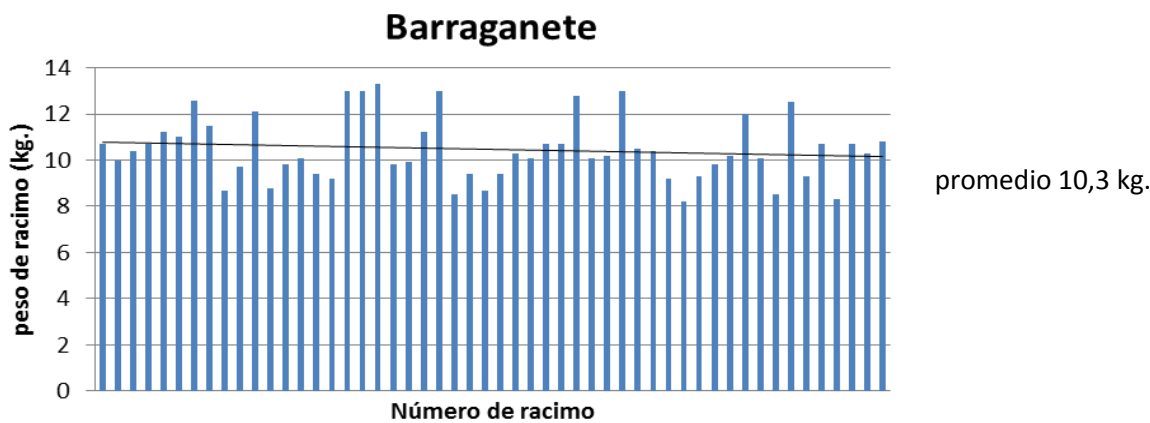


Figura 1. Peso promedio de racimo en plantas de producción normal de plátano “Barraganete”.¹

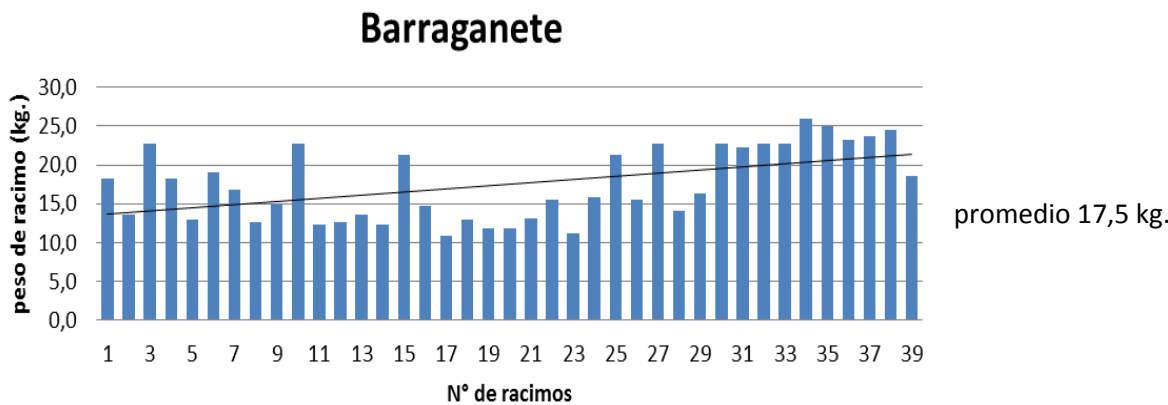


Figura 2. Peso promedio de racimos de plátano “Barraganete” altamente productivos (Banco de Germoplasma)

¹ Datos proporcionados por el Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas EELS-INIAP. 2011



Figura 3. Diferencia entre un racimo de peso normal (izquierda) y uno de una planta altamente productiva (derecha) del cultivar “Barraganete”.

El peso promedio de racimos de las plantas altamente productivas de “Barraganete” es de 17,5 kg., superior al peso promedio de los racimos de las plantas de producción normal que tuvieron un promedio de 10,3 kg. Igualmente se comportaron las plantas de producción normal (Figura 4) del cv. “Dominico”, que alcanzan un promedio de 24,3 kg. comparadas con las plantas altamente productoras de “Dominico” que promediaron 36,8 kg. (Figura 5).

Dominico

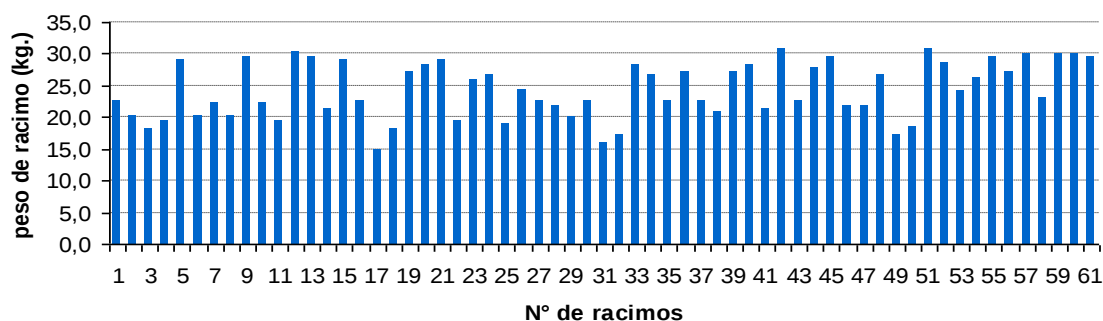


Figura 4. Peso promedio de racimo en plantas de producción normal de plátano “Dominico” provenientes de varias zonas productoras.

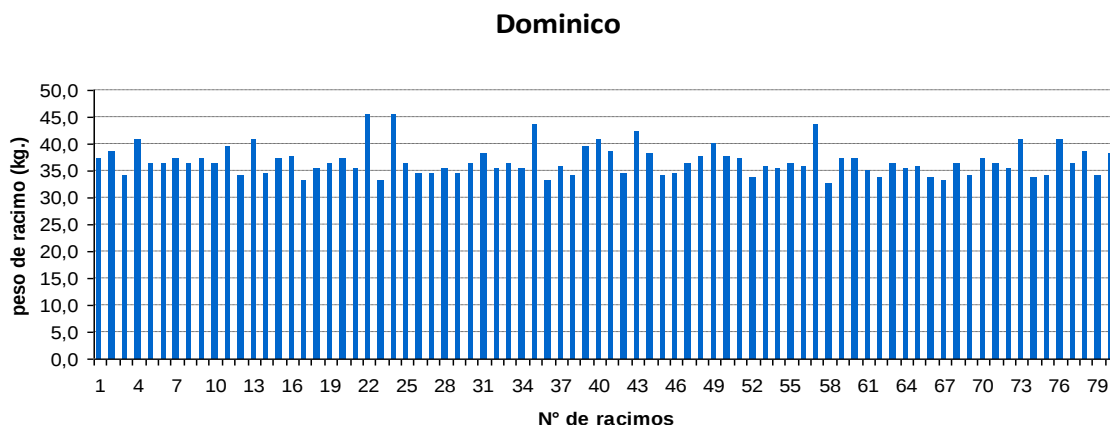


Figura 5. Pesos promedio de racimos de plátano “Dominico” altamente productivos (Banco de Germoplasma²)

En la Figura 6 se observa la diferencia entre un racimo normal y uno de peso superior.



Figura 6. Diferencia entre un racimo de peso normal (izquierda) y uno altamente productivo (derecha) cv. “Dominico”.

2.4. Mejoramiento y conservación del germoplasma

Paredes (*sf.*) indica que un banco de germoplasma es una unidad dinámica donde se conserva por tiempo indefinido la mayor diversidad genética posible, expresada por un

² Datos proporcionados por el Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas EELS-INIAP. 2011

alto número de biotipos representativos de una especie. Los bancos de germoplasma prestan servicio a los programas de mejoramiento, aportando materiales y datos útiles para la producción de cultivos superiores, resistentes a plagas y enfermedades entre otros. Estos bancos deben reunir toda la variabilidad genética posible de cada especie que se considera importante o con potencial.

Así mismo Paredes (sf.) revela que la principal ventaja de la reproducción vegetativa es la conservación de las características de la planta progenitora. Las plantas propagadas asexualmente constituyen un clon. Todos los clones son genéticamente idénticas en herencia y conservan las características de la planta progenitora original siempre y cuando sean sembradas bajo las mismas condiciones ambientales; esto significa que un material puede conservar sus características, aun cuando tal clon sea totalmente heterocigoto. De modo que si en tal clon, se presenta una mutación o un cruzamiento favorable, se puede seleccionar para posteriores pruebas.

Actualmente existen cerca de seis millones de muestras almacenadas en todo el mundo en bancos de germoplasma *ex situ* (almacenamiento de semillas a bajas temperatura y humedad). Los cereales tales como: el trigo (*Triticum sativum* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el maíz (*Sea mayz* L.) están bien representados. Muchos cultivos tropicales no pueden ser almacenados como semillas y deben ser mantenidos como colecciones vivas en bancos de germoplasma de campo o mediante el mantenimiento *in vitro* (Román, Alonso y Barrios 1997).

Whithers (1992) asegura que las especies de plantas de propagación vegetativa, con un ciclo biológico largo o con semillas recalcitrantes, se suelen mantener en bancos de germoplasma de campo. Entre ellos la yuca (*Manihot esculenta* C.), la papa (*Solanum tuberosum* L.) y principalmente los bananos y plátanos.

En el mundo hay muchos países que mantienen bancos de germoplasma de bananos y plátanos, entre ellos el Sureste Asiático, Indonesia, Tailandia, Brasil, Filipinas, Costa Rica, África Oriental y Central, entre otros. (Román, Alonso y Barrios 1997)

La Red Internacional para el Mejoramiento de Banano y Plátano (INIBAP) es responsable por la colección mundial del germoplasma de *Musa*. Consta de 1500 especies tanto silvestres como variedades cultivadas. Esta colección se mantiene *in vitro* en Bélgica (Panis, 2003).

2.5. Variabilidad genética

La variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse. Ya que los individuos de una misma especie no son idénticos aunque se reconozcan como pertenecientes a la misma especie, existen muchas diferencias en su forma, función y comportamiento. Cada característica que se pueda nombrar de un organismo tiene variaciones dentro de la especie (Mateu, 2004).

La evaluación de los recursos genéticos de una población puede ser estimada por los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones. Esta variabilidad puede ser expresada de varias formas como lo son: (1) la heterocigosis promedio; (2) el número de alelos por locus y (3) el porcentaje de loci polimórficos (Baker, 2000).

Gran parte de la variación en los individuos proviene de los genes; es decir variabilidad genética. Esta variabilidad se origina por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (número, forma, tamaño y ordenación interna de cromosomas). Los procesos que dirigen o eliminan la variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética (Mateu, 2004).

Para Ertola, Yantorno y Mignone (*sf.*), en cada división celular hay una pequeña probabilidad de que ocurra un cambio genético. Estos cambios (mutaciones) se deben distinguir de las variaciones fenotípicas que dependen de las condiciones ambientales. En las mutaciones espontáneas el elemento responsable de la mutación no es conocido. La frecuencia de mutaciones espontáneas varía entre 10^{-6} a 10^{-9} mutaciones por genoma y por generación.

Román, Alonso y Barrios (1997) sugieren que la obtención de nuevas variedades de un cultivo requieren de la utilización de la variabilidad genética como punto de partida. Además, señalan que son numerosos los métodos existentes para determinar el grado de variabilidad entre las diferentes poblaciones, tales como: a). Los métodos basados en la morfología que permiten analizar los distintos rasgos observables (fenotipos) entre las plantas y b). Los análisis citogenéticos y moleculares o genético-bioquímico que permiten analizar las diferencias entre los cromosomas, las proteínas o el ADN de las plantas.

García *et al.* (2002) indica que la mayoría de los cultivares de plátanos y bananos se originaron a partir de mutaciones espontáneas. Según FAO/IAEA se han liberado dos cultivares de banano, obtenidos por inducción de mutaciones.

La variabilidad genética de *Musa* spp. según Peteira *et al.* (2003), ha sido estudiada con la utilización de descriptores morfológicos y diferentes marcadores, tales como: isoenzimas, RAPD, RFLP, VNTR y AFLP.

2.6. Caracterización del germoplasma

Jaramillo y Baena (2000) mencionan que, la caracterización consiste en describir sistemáticamente las accesiones a partir de características cualitativas y estas se realizan en una población representativa mediante una lista de descriptores que brinden información comparable y compatible.

En primer orden, la caracterización e identificación tradicional de variedades se basaron en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Rallo *et al.*, 2002). No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas presenta muchas limitantes, pues su expresión está sujeta a factores ambientales o fenológicos (Azofeifa, 2006).

Por otro lado Jaramillo y Baena (2000) afirman que la caracterización también se puede realizar mediante marcadores genéticos, que estudian directamente el genoma sin

evaluar el efecto ambiente. Dentro de los marcadores citados están: marcadores bioquímicos (isoenzimas) y moleculares (microsatélites, RAPD's, AFLP's, etc.).

Demey (2003) manifiesta que las caracterizaciones generadas a través de descriptores morfológicos y marcadores moleculares suelen ser independientes, respondiendo en cada caso a reglas y presiones evolutivas diferentes. Además, recomiendan que al incluir en estudios, descriptores morfológicos y marcadores moleculares se puede obtener una mejor descripción e interpretación de la diversidad genética de una población.

2.6.1. Marcadores morfológicos

Gallo *et al.*, (2006) indican que los primeros marcadores génicos fueron morfológicos y corresponden a los determinados por Mendel en sus históricos y notables estudios con materiales segregantes de *Pisum* → *sp.* y *Phaseolus sp.*, a partir de los cuales formuló las leyes que incluso aún rigen en la genética.

Dadzie y Orchard (2003), resaltan que los caracteres morfológicos se distinguen a lo largo del desarrollo del cultivo, especialmente en la madurez. Para su identificación se requiere de personal entrenado y la caracterización depende de la subjetividad del mismo. La expresión de estos marcadores es dependiente de variaciones en las condiciones ambientales. Por ejemplo: color de pseudotallo, presencia o ausencia de pubescencia, etc.

La caracterización morfoagronómica se ha realizado tanto para plátano como para Banano en distintos lugares, entre ellos Colombia (Parra 2009). En Ecuador esta caracterización se hizo para plátano (Becerra, 1999).

2.6.2. Marcadores moleculares

Para Valadez y Kahl (2000) citados por Azofeifa (2006), un marcador se refiere a cualquier isoenzima, molécula de proteína ARN o ADN de tamaño o peso molecular

conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas, utilizando electroforesis o cromatografía. Un marcador genético puede ser cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente.

Los primeros marcadores moleculares desarrollados a finales de los 70's, se basan en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico, con la limitación de no tener la capacidad de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de un tejido a otro, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades (Claros, 2002).

2.6.2.1. Marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Según Ferreira y Grattapaglia (1998), PCR es una técnica que comprende la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa y que se desarrolla en tres etapas: desnaturalización (con temperaturas de 92 a 95° C), apareamiento (entre 35 y 65° C dependiendo del tamaño y secuencia del iniciador) y elongación o polimerización (entre 72 y 95° C).

Valadez Y Kahl (2000) indica que, las tecnologías que utilizan secuencias aleatorias, semialeatorias o específicas de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables no mayores a 6kb, son aquellas basadas en la reacción de polimerización en cadena PCR (Polymerase Chain Reaction). Citando por ejemplo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), entre otras.

El uso de marcadores moleculares como los RAPD y AFLP son más frecuentes y se utilizan mayormente para el análisis de la variabilidad genética en diferentes cultivos.

Wendt e Izquierdo (2002), recomiendan que, como en el caso del arroz, en banano y plátano se deben aplicar los marcadores moleculares para facilitar la selección de características favorables para el cultivo.

Al caracterizar genéticamente al plátano aplicando técnicas moleculares tales como RAPD's, en Kenya (Onguso *et al.* 2003) en México (Nadal *et al.* 2009); SSR en Honduras (FHIA, 2004); la mayoría de las áreas plataneras en el mundo tienen alto nivel de identidad genético, y se cree que las mutaciones somáticas son las responsables de la diversidad de morfotipos de plátanos (Daniells, Karamura y Tomekpe 2001)

Wong *et al.*, (2002) al igual que Dina *et al.*, (2009) revelan que estudios taxonómicos en *Musa* se han llevado a cabo usando varias técnicas como; caracteres morfológicos, isoenzimas, citogenéticos, citogenéticos moleculares, espaciadores intergénicos, RFPL's, RAPD's, ISSR's y microsatélites

2.6.2.1.1. RAPD's

El marcador molecular RAPD por sus siglas en inglés (Randomly amplified polymorphic DNA), es una herramienta valiosa para identificar variaciones genéticas porque es económico, rápido y simple. Permite la identificación de los polimorfismos del ADN y puede ser usado para amplificar fragmentos particulares del ADN genómico (Thawaro y Te-chato, 2008).

Thawaro y Te-Chato (2008) mencionan que los análisis RAPD's están basados en la presencia o ausencia de polimorfismos individuales o un grupo de ellos. Ferreira y Grattapaglia (1998) añaden que los *loci* de los marcadores RAPD's están distribuidos al azar a lo largo del genoma y que al ser arbitrarios no requieren conocimiento previo de la secuencia de ADN para la construcción de los oligonucleótidos.

Según Valadez y Kahl (2005) citados por Cerón (2010), los RAPD's son iniciadores de secuencias de 10 pares de bases (pb) arbitrarias o aleatorias, que tienen un contenido de GC (guanina y citosina), mayor a 50%.; no tienen secuencias repetidas inversas internas y se pegan a distintos sitios del genoma. Esa unión es reconocida por la enzima Taq ADN polimerasa que inicia el alargamiento del iniciador cuya secuencia de bases es complementaria a la cadena molde. El producto de la amplificación alcanza un número de copias de 10^6 y puede ser visualizado con electroforesis después de teñirse el gel con bromuro de etidio.

Para Ferreira y Grattapaglia (1998), el ADN es el parámetro más crítico para el éxito del ensayo RAPD's; sin que sea este extremadamente puro, la concentración que recomiendan es de 2 a 20 ng. Por tanto y según como anuncia Freire (2010), para la extracción es recomendable usar muestras frescas, tomadas de brotes u hojas jóvenes y de preferencia si las plantas fueron regadas el día anterior, ya que de esa manera el ADN tiene mayor disponibilidad y se obtiene un ADN de buena calidad.

Quiróz (2002), indica que la característica de dominancia de los marcadores RAPD's al igual que la de los AFLP's se debe a que por su bajo contenido de información genética por locus solo detecta un alelo (fragmento que se amplifica). Sus datos son de naturaleza binaria y se procesan como presencia ó ausencia.

Kumar *et al.* (2007), enuncian que los RAPD's han sido usados como marcadores en la caracterización de *Malus spp* L., *Vitis vinifera* L., *Citrus limon* B., *Prunus species*, *Manihot esculenta* (Demey *et al.*, 2003) *Pyrus cummunis* L. *Oryza sativa* L., entre otros.

2.7. Análisis de los datos de la caracterización

Jaramillo y Baena (2000), acotan que el análisis de datos en cuanto a trabajos de biología molecular, se puede hacer mediante métodos simples o complejos que van desde el uso de gráficos hasta los análisis estadísticos mediante comparación de medias, multivariados, de conglomerados y de similitud.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica

La presente investigación se realizó durante el periodo Marzo 2010 – Agosto 2011, en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja” del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP); ubicada en las coordenadas geográficas 2° 15’ 15’’, latitud Sur y 79° 30’ 40’’ de longitud occidental a 17 msnm., en el km. 26 al este de Guayaquil en la vía Durán – Tambo, parroquia Virgen de Fátima, cantón Yaguachi, provincia del Guayas.

3.2. Materiales

3.2.1. Material experimental

Inicialmente se colectaron 40 muestras de “Dominico” y 40 de “Barraganete” de los materiales élitos localizados en la colección de la EELS, procedentes de varias zonas plataneras del Ecuador. Sin embargo; considerando que el Banco de Germoplasma a la fecha de inicio del trabajo contaba con un mayor número de individuos y con el fin de ampliar la información, se planteó la extracción del ADN de 80 muestras de “Dominico” y 40 de “Barraganete”.

El código, procedencia, fechas de colecta y siembra de los cultivares de “Dominico” y “Barraganete” estudiados constan en el Anexo 1 y 2 y el croquis en el Anexo 3.

3.2.2. Materiales de laboratorio, reactivos y equipos

Los materiales y reactivos que se utilizaron en esta investigación se detallan en los Anexo 4 y 5 respectivamente y los equipos en el Anexo 6.

3.3. Factor en estudio

El factor en estudio es la variabilidad genética intraespecífica de los cultivares de plátano “Dominico” y “Barraganete” utilizando la técnica molecular RAPD’s.

3.4. Tratamientos

80 accesiones de plátano cv. Dominico y 40 del cv. Barraganete.

3.4.1. Colección de muestras

De las plantas existentes en el Banco de Germoplasma de la EELS, se muestreó la parte media de la hoja cigarro de 80 clones del cv. “Dominico” y 40 del cv. “Barraganete”. Cada muestra se colocó en una funda plástica identificándose el clon, código de campo y la fecha de recolección. Posteriormente se colocaron en una caja de espumaflex que contenía hielo, creando de esa forma un ambiente fresco en el interior hasta trasladarlas al laboratorio y así evitar la oxidación de las hojas y degradación del ADN.

3.4.2. Extracción de ADN vegetal

Se probaron los protocolos propuestos por Viruel y Hormaza (2002), Zambrano (2002), EMPRAPA (2010) que constan en el Anexo 7, A, B Y C respectivamente.

Se seleccionó el protocolo propuesto por EMBRAPA (2010) realizando ciertas modificaciones que permitieron obtener un ADN de calidad y cantidades representativas.

Los cambios se hicieron como se detalla a continuación: Se pesó 1g. de hoja y se colocó en el mortero, macerando con 700 uL de buffer (2 ml. de CTAB 1%, 2,8 ml. NaCl 1,4M, 1 ml. Tris-HCl 100 mM. pH 8.0; 0,4 ml. EDTA 20 mM., 0,1 g. PVP uL β -mercaptoetanol 0,1% y 3,7 ml. agua destilada). El producto de la maceración se transfirió

a microtubos de 2 ml. y se adicionó 500 ul de buffer. Se incubó en baño maría a 65°C durante 60 min., agitando suavemente cada 15 min., se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se adicionó igual volumen de CIA (24:1), agitando por inversión durante 5 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos y se transfirió la fase superior a otro tubo. Nuevamente se adicionó CIA en igual volumen y se mezcló por inversión durante 5 min.; se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm. Se transvasó a un tubo nuevo para la precipitación de los ácidos nucleicos adicionando 2/3 del volumen de isopropanol helado. Se dejó reposar 3h a 20°C. Se centrifugó por 10 min. a 12000rpm. y se retiró el isopropanol, después se realizaron dos lavados al *pellet* con 500 uL de etanol 70 %, centrifugando por 5 min. Se descartó el etanol y se secó en la estufa a 37°C por 30 min. Posteriormente se resuspendieron los ADN's en 100ul de TE 1X pH 8.0.

3.4.3. Cuantificación del ADN genómico

Para cuantificar el ADN se utilizó 2 métodos.

- a) Comparación visual de bandas con un marcador de talla y peso molecular *Low Mass Ladder* Cat. 10068013 INVITROGEN.

Sobre una lámina de parafilm se colocó de 1µL de blue juice BJ (azul de carga) por cada muestra, a esto se adicionó 4 µl de ADN y se mezcló utilizando una punta independiente para cada una de las muestras. Se preparó un gel de agarosa al 0,8 % que se colocó en la cámara de electroforesis horizontal marca CBS Scientific CO Modelo SGU-020T-02. En dicho gel se cargaron 2µl de la mezcla (blue juice-ADN) dejando siempre el primer pozo para el marcador. Se migró el gel durante 45 min. a 100 V. en el buffer de corrida TAE 1X (pH 8,0). Posteriormente se realizó el teñido del gel en bromuro de etidio (BrEt) (15ppm). Los resultados se visualizaron en un transiluminador Benchtop UVP a través de luz ultravioleta y finalmente fueron fotodocumentados. En las imágenes obtenidas comparando las bandas generadas por cada muestra con la del marcador, se estimó la cantidad aproximada de ADN existente y la calidad del mismo. (Anexo 8)

- b). Fluorimetría mediante Qubit (Cat.Nº Q32851). Las cantidades constan en el Anexo 9.

3.4.4. PCR

3.4.4.1. Oligonucleótidos

Se utilizaron los oligonucleótidos RAPD's basándose en aquellos que presentaron mayor polimorfismo en estudios realizados para musáceas, por los investigadores Onguso *et al.*, (2003) Nadal, (2009) y Venkatachalam, Sreedhar y Bhagyalakshmi (2008). Se consideraron los 5 mejores oligonucleótidos de cada publicación. Sus secuencias están descritas en el Anexo 10.

3.4.4.2. Selección de oligonucleótidos

Se realizó la selección de los 15 iniciadores con 5 individuos al azar de cada cultivar, utilizando el kit de Taq polimerasa Cat. No. 11615-036. Además se probaron 3 concentraciones de ADN (2, 5 y 10 ng) y 2 de los iniciadores (1 y 3 µl) diluidos a una concentración de 10 µM.

Los componentes del mix para la PCR en un volumen total de 25uL fueron 2,5 uL de buffer 10x; 1,2 uL Cl₂Mg 50 mM., 0,5 dNTP 10mM. y 16,5 uL de agua ultrapura.

Las condiciones de amplificación de la PCR fueron aquellas establecidas por Onguso *et al.* (2003) con modificaciones en tiempo y temperatura de las etapas de denaturación y de alineamiento como se presenta a continuación en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Condiciones de amplificación de la PCR. Onguso *et al.* (2003).

Etapas	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Predenaturación	4 minutos	94°C	1
Denaturación	1 minuto	94°C	40
Alineamiento de iniciadores	1 minuto	35°C	1
Polimerización	1minuto	72°C	1
Extensión final	8 minutos	72°C	1

3.4.4.3. Cóctel de amplificación o mix

Posteriormente se planteó un cambio de reactivos para disminuir los costos y se repitió desde la selección con todos los oligonucleótidos pero tomando el ADN de 6 individuos (3 de “Dominico” y 3 de “Barraganete”). Los reactivos para la nueva selección y durante el desarrollo del trabajo de genotipaje se hicieron con buffer 5x (EMBRAPA, 2000) y con Taq polimerasa proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, 2010. (Anexo 11).

Cuadro 2. Reactivos para preparación de mix PCR. (Morillo y Miño, 2010).

Reactivo	Cantidad en uL
AUP	2,3
Buffer 5x	2,2
iniciador	0,5
dNTP's	0,4
Taq	0,2
Total por Rx	5,6

La disposición del mix se hizo en la cámara de flujo laminar para asegurar la esterilidad del ambiente manteniendo los reactivos en hielo.

3.4.4.4. Amplificación de ADN polimórfico

Se hizo alícuota de cada ADN a 5 y 10 ng de concentración. Preparado el mix, se añadieron los ADN's en las placas PCR de 96 tubos, se distribuyó 5,6 uL de mix en cada tubo y se adicionó aceite mineral dos veces la cantidad de producto dispensado.

3.4.4.5. Programación del termociclador para la PCR

Las placas se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones de amplificación. Morillo y Miño (2010).

Cuadro 3. Condiciones de amplificación de la PCR. Morillo y Miño (2010).

Etapas	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Predenaturación	5 minutos	94°C	1
Denaturación	30 segundos	94°C	40
Alineamiento de iniciadores	1 minuto	42°C	1
Polimerización	2minuto	72°C	1
Extensión final	7 minutos	72°C	1
Conservación	5 minutos	10°C	1

3.4.4.6. Visualización de amplicones y documentación

Se realizaron las corridas electroforéticas colocando los amplicones y el marcador 100 bp. (Cat. N°15628-019, INVITROGEN), en gel de agarosa al 1.5 % en cámara de electroforesis horizontal a 100 V por 90 min. Luego se hizo la tinción del gel en bromuro de etidio a 15ppm de durante 30 min. con agitación constante y en completa oscuridad. Luego, se colocó el gel en el transiluminador y allí se documentaron los resultados.

3.5. Análisis estadístico

De los 15 oligonucleótidos se seleccionaron 5 para caracterizar cada subcultivar de plátano (OPA 03, AA10 AA14, OPC 02 y OPC 04 para “Dominico” y OPA03, OPA 04, OPA 11, AA10 y AA14 para “Barraganete”). Con todos los resultados gráficos de los geles se hizo la lectura y se realizaron las matrices de presencia - ausencia (1-0) de bandas polimórficas por peso molecular y en orden descendente.

Se calcularon:

a). Las distancias genéticas entre dos muestras partiendo de la matriz binaria, mediante el coeficiente de asociación de Jaccard, con la siguiente fórmula:

$$S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

S_j = coeficiente de similitud de Jaccard

a = número de muestras en donde ambas especies están presentes

b = número de muestras en donde B aparece pero A ausente

c = número de muestras en donde A aparece pero B está ausente

b). A partir de la matriz de distancias se hizo la construcción de árboles genéticos. Se probaron los métodos de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Average) (Nei y Kumar, 2000) en la distancia de Nei (1978) donde p es la frecuencia de la banda en los ecotipos y n el número de individuos analizados:

$$h_k = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)$$

Los árboles fueron visualizados en TREEVIEW 1.6.6 (Page, 2000); Además, se evaluó la robustez de los dendrogramas a través del remuestreo y generación de 100 matrices de distancias genéticas desarrolladas a partir de matrices de distancias reconstruidas y reducidas como se realizó el análisis de conglomerados original (Nei y Li, 1979; Skroch and Nienhuis, 1995), de modo que se estimaron los límites de confianza de cada comparación apareada (Felsenstein, 1985). El análisis de robustez se realizó con el programa FigTree (Hampl *et al.*, 2001).

Se hizo un análisis de coancestrías que permitió un arreglo de la información genética con 300000 permutaciones para obtener resultados consenso. Se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard and Wen, 2000), el cual utiliza algoritmos de agrupamiento Bayesianos con los métodos en cadena de Montecarlo MCMC (Monte Carlo Markov Chain) y la asignación de genotipos a un número predeterminado de poblaciones (K) de un número de muestras (X) en base al equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento.

Este método asume un modelo de K poblaciones, cada una caracterizada por un set de frecuencias de alelos para cada locus. Los individuos en la muestra son asignados probabilísticamente a poblaciones, o asignados a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que tienen genotipos similares. La magnitud y dirección del flujo genético están basados en la proporción de ancestros estimados de cada individuo (q) y cada población (Q) (Martínez *et al.*, 2007).

IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación de protocolos de extracción, cuantificación y validación de ADN.

El protocolo propuesto por EMBRAPA (2010) resultó mejor en cuanto a calidad y cantidad de ADN obteniéndose promedios de 144 y 99 ng/uL para “Dominico” y “Barraganete”, respectivamente (Figura 7 y 8). Los valores de la cuantificación y test de integridad constan en el Anexo 8 y 9, respectivamente.

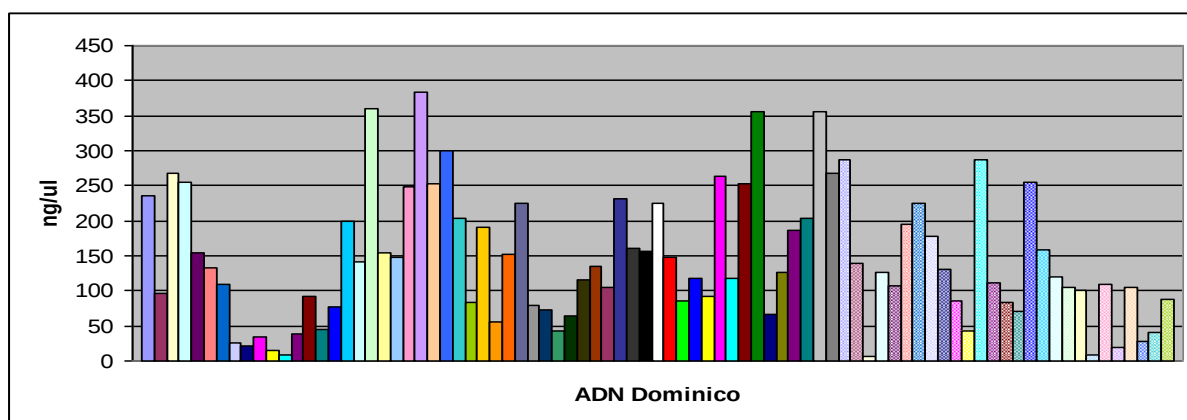


Figura 7. Rendimientos de ADN de las 80 accesiones de plátano “Dominico” cuantificado por fluorimetría.

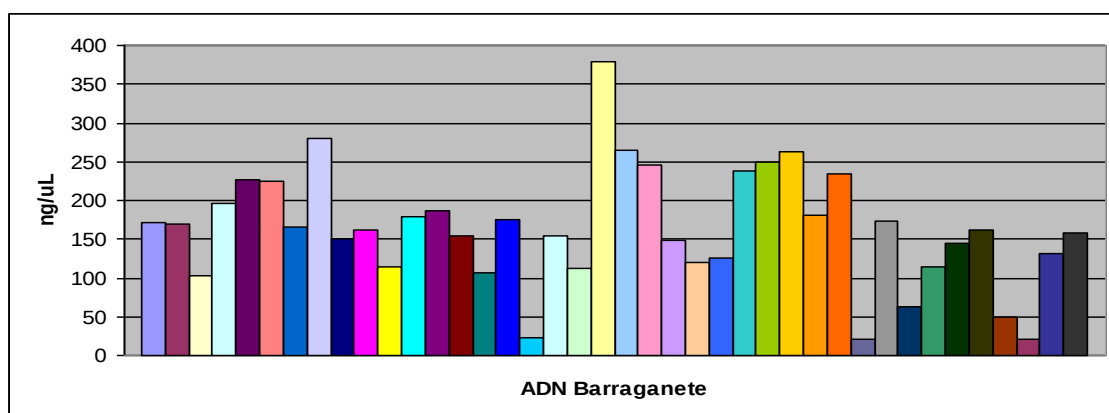


Figura 8. Rendimientos de ADN de las 40 accesiones de plátano “Barraganete” cuantificado por fluorimetría

Debido a las altas concentraciones de ADN obtenidas, las muestras se diluyeron a 10ng. para el análisis RAPD.

4.2. Selección de oligonucleótidos y análisis RAPD

De los 15 iniciadores (Anexos 12, 13 y 14), para cada subcultivar se escogieron 5 oligonucleótidos los cuales generaron 32 bandas para “Barraganete” (Cuadro 4) y 37 para “Dominico” (Cuadro 5). El porcentaje de marcadores polimórficos fue de 62 % para “Dominico” siendo el más polimórfico el AA 14 y 67 % de polimorfismo en “Barraganete” y con mayor número de bandas polimórficas el OPA 04.

Cuadro 4. Determinación del porcentaje de polimorfismo de iniciadores seleccionados para el análisis de Barraganete.

Iniciador RAPD	Productos Amplificados		N°de bandas	Polimorfismo (%)
	Monomórficos	Polimórficos		
OPA 03	2	5	7	71,43
OPA 04	4	7	11	63,64
OPA 11	2	5	7	71,43
AA10	2	2	4	50,00
AA14	3	4	7	57,14
			TOTAL	62 %

Cuadro 5. Determinación del porcentaje de polimorfismo de iniciadores seleccionados para el análisis de Dominico

Iniciador RAPD	Productos Amplificados		N°de bandas	Polimorfismo (%)
	Monomórficos	Polimórficos		
OPA 03	3	5	8	62,50
AA 10	2	3	5	60,00
AA 14	3	8	11	72,73
OPC 04	2	5	7	71,43
OPC 02	2	4	6	66,67
			TOTAL	67%

4.3. Genotipaje

Los registros de bandeo producto de la amplificación realizada con los 5 iniciadores para “Dominico” como para “Barraganete” constan en los Anexos 15 y 16.

4.4. Diversidad genética

Se realizó el análisis de la diversidad genética basándose en la matriz de datos binarios generada a partir de la lectura de los geles de manera general y clasificando los datos por poblaciones (procedencia). Los índices generales de diversidad son de 0,54 en “Dominico” y 0,63 en “Barraganete”. Los resultados del análisis general y por población constan en los Cuadros 5 y 6 para “Dominico” y “Barraganete” respectivamente.

Cuadro 5. Índices de diversidad genética de plátano cv. “Dominico” por sitio.

PRIMERS	PLAYONES			R. ASTUDILLO		M. MARIDUEÑA
OPA 03	0,56	0,67	0,54	0,65	0,65	0,80
AA 10	0,67	0,45	0,61	0,42	0,40	0,36
AA 14	0,65	0,61	0,20	0,56	0,11	0,78
OPC 04	0,58	0,79	0,58	0,65	0,53	0,74
OPC 02	0,52	0,20	0,51	0,29	0,64	0,46
INDICE DIVERSIDAD POR SITIO	0,60	0,54	0,49	0,52	0,47	0,63
PROM. DIVERSIDAD POR ZONA			0,54		0,49	0,63
INDICE DE DIVERSIDAD GENETICA TOTAL						0,54

Cuadro 6. Índices de diversidad genética de plátano cv. “Barraganete” por iniciador .

OPA 03	OPA 04	OPA 11	AA10	AA14	Diversidad genética total
0,59	0,74	0,58	0,62	0,64	0,63

4.5. Análisis de clusters

El análisis en “Barraganete” con los iniciadores OPA 03, OPA 04, OPA 11, AA10 y AA 14 produjeron un valor de H_T de 0,63. El dendrograma generado a partir de la matriz

de diversidad genética para “Barraganete” permitió diferenciar 5 grupos. La distancia determinada por el coeficiente de Nei y Li (1979) y el análisis de agrupamiento fue dada por ligamiento simple y similitud máxima. A pesar de mostrarse dos grupos, se puede mencionar que debido a la distancia genética que muestra el análisis, todas las accesiones están emparentadas. Las accesiones 8 y 29 constan como duplicados. Las distancias se miden de 0 a 1.

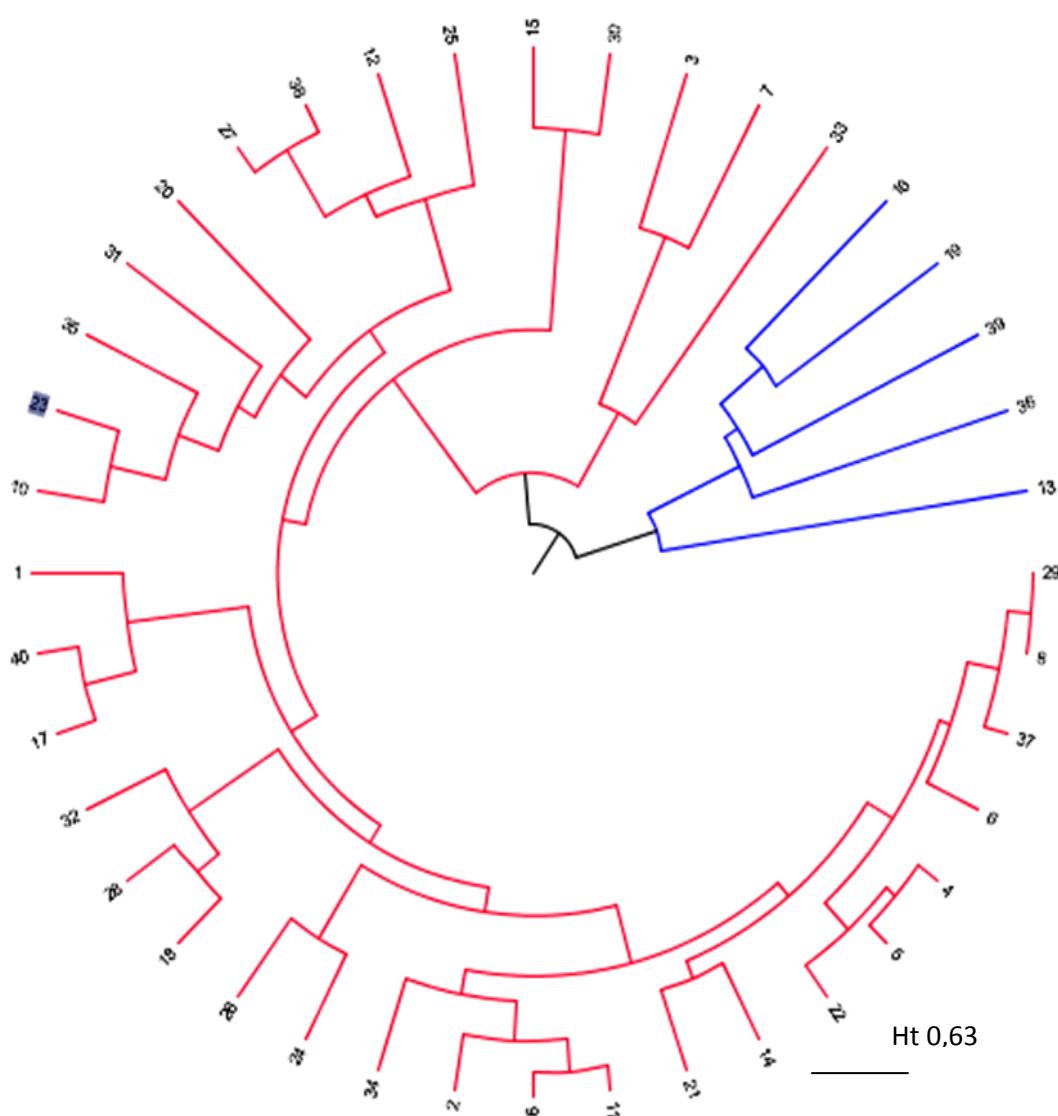


Figura 9. Dendrograma de accesiones de plátano “Barraganete” en base a datos RAPD y aplicándose el método UPGMA y el coeficiente de asociación de Jaccard.

Para las accesiones de “Dominico” se trabajó con los cebadores OPA 04, AA10, AA14, OPC 02 y OPC 04 que dieron como resultado un H_t de a 0,53. Así como en el dendrograma anterior, para la generación del dendrograma se utilizó el método de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA), con la distancia de Nei and Li (1979).

En la Figura 10 se observa 5 grupos de individuos. Adicionalmente al generar una nueva matriz con los datos de “Dominico” para analizarlos mediante el método UPGMA con el coeficiente de Nei standard para determinar la relación pero por poblaciones se pudo diferenciar en el dendrograma, que se formaron 3 grupos de procedencias geográficamente cercanas. (Figura 11).

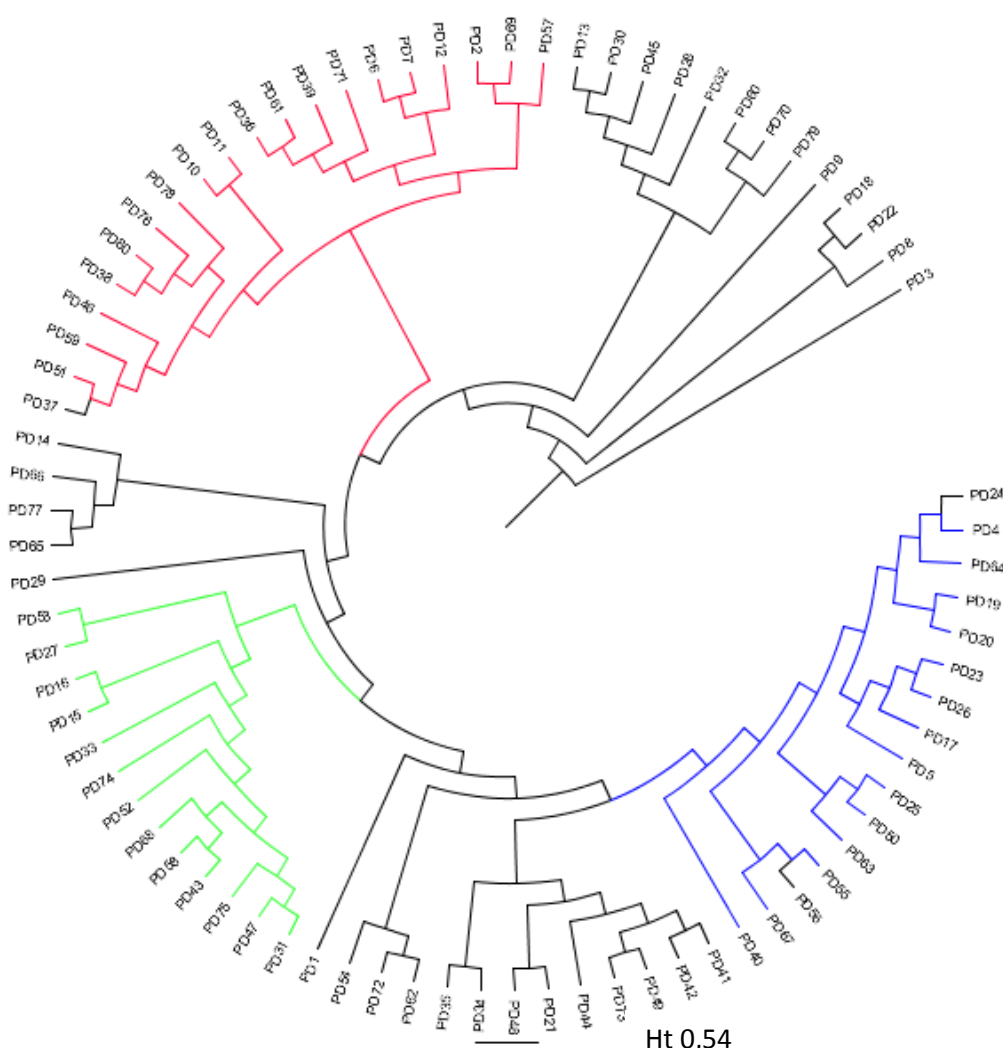


Figura 10. Dendrograma de accesiones de plátano “Dominico” en base a datos RAPD (UPGMA y coeficiente de Nei y Li)

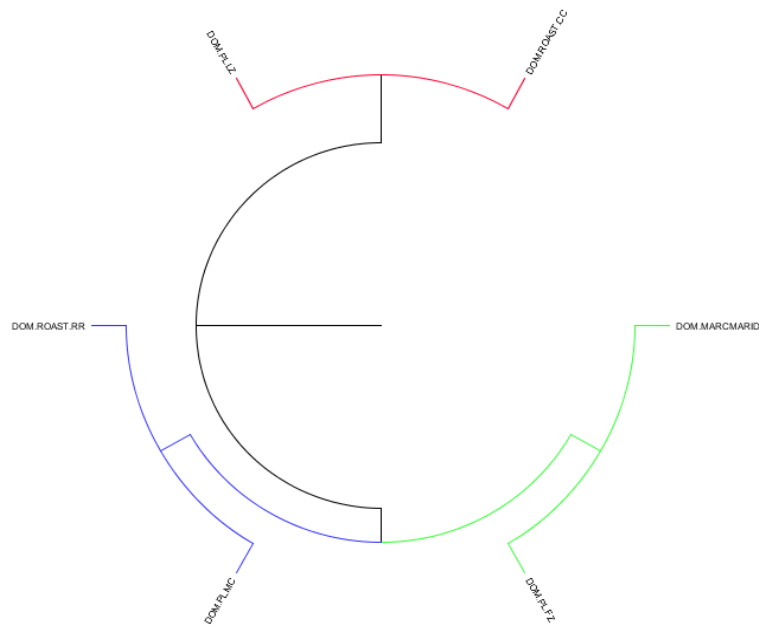


Figura 11. Dendrograma plátano “Dominico” por localidades analizados con el método UPGMA y el coeficiente de Nei standard.

Para $K = 2$ el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano se observa en ambos cultivares que las poblaciones no se dividen sino que muestran relativa homogeneidad en las grupos intraespecíficos. (Figura 12). En esta investigación se consideró un valor de $K=2$ para la asignación genética de dos grupos coancestros

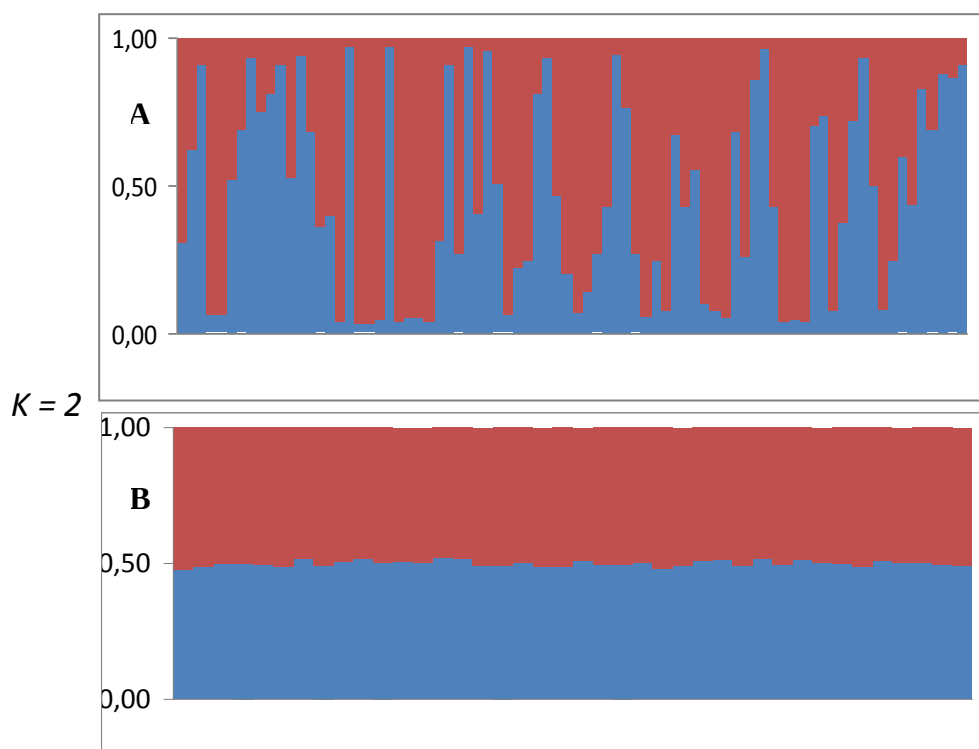
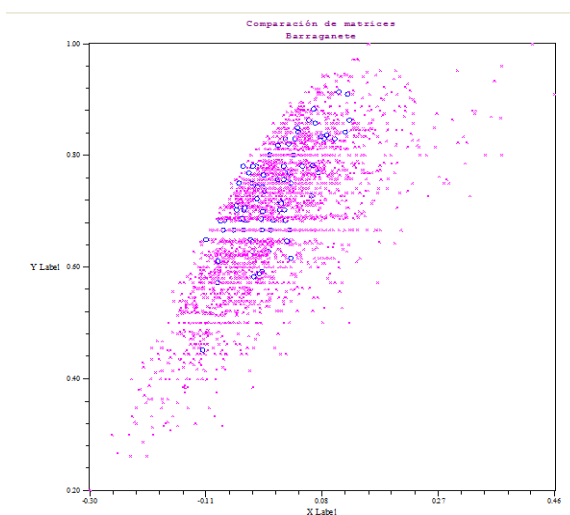


Figura 12. Resultado del análisis de coancestrías con enfoque Bayesiano para las muestras de “Dominico” (A) y “Barraganete” (B)

El análisis de robustez de los dendrogramas generó 100 matrices en base a la matriz original. El límite de confianza de los apareamientos grupales fue de $r=0,78$ en “Barraganete” (Figura 13) y $r=0,73$ “Dominico” (Figura 14).



Dispersión de las matrices generadas por reconstrucción y reducción para determinar el límite de confianza en “Barraganete”.

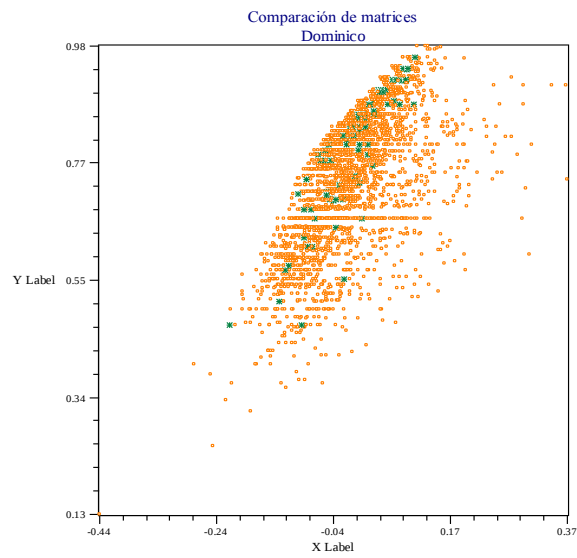


Figura 14. Dispersión de las matrices generadas por reconstrucción y reducción para determinar el límite de confianza en “Dominico”.

V. DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de protocolos de extracción, cuantificación y validación de ADN.

Desde el desarrollo de la Biología Molecular se ha llevado a cabo la caracterización de un sinnúmero de especies con tecnologías basadas en la PCR (Becerra y Paredes, 2000). Por tanto el punto de partida es tener en cuenta los requerimientos de esta técnica para una buena reacción PCR. Ferreira y Grattapaglia, 1998 mencionan que, uno de los aspectos más importantes es un ADN óptimo. De acuerdo a Gooding, Bird y Robinson (2000) el ADN de plátano puede contener altas concentraciones de polisacáridos, polifenoles y taninos que degradan al ADN.

En el caso de esta investigación y por las razones antes descritas durante la extracción se presentaron ciertas dificultades, sin embargo con las modificaciones realizadas al protocolo de EMBRAPA en las cantidades de β mercaptoetanol y PVP como recomienda Moreno *et al.* (2004), se obtuvo ADN de calidad y cantidad apropiada. Los rendimientos luego de la extracción fueron muy altos, siendo de 144 y 99 ng/uL para “Dominico” y “Barraganete” respectivamente; cantidades que fueron significantes para llevar a cabo este estudio.

Selección de oligonucleótidos y análisis RAPD

El ADN del 97% de las muestras de “Dominico” y del 73 % de “Barraganete” fueron diluidos a 5 ng., para optimizar el proceso de amplificación por PCR; ya que un factor clave en el análisis RAPD es la concentración del ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Las concentraciones altas dificultan la lectura de las bandas en el gel, mientras que, las bajas ocasionan la pérdida de bandas importantes que serían visibles con concentraciones adecuadas.

Para este trabajo se escogió la técnica RAPD debido a que es recomendada en el estudio de especies donde no se conoce su secuencia genómica (Ferreira y Grattapaglia,

1998) por ser una metodología rápida, sencilla, y de costos reducidos, además, ya ha sido utilizada para caracterizar molecularmente otras musáceas por Onguso *et al.* (2003), Venkachatalam, , Sreedhar y Bhagyalakshmi (2008). Así mismo, en ella no hay intervención del ambiente, por tanto, se elimina la confusión asociada con la identidad entre cultivares que comparten características fenotípicas (Nadal, 2009).

Genotipaje

Los oligonucleótidos decámeros (Cerón, 2010) de secuencias cortas y con un alto contenido de GC (guanina y citocina), mayor a 50% se seleccionaron por la cantidad de información polimórfica que presentaron según los reportes de (Nadal, 2009); (Onguso *et al.*, 2003) y (Venkatachalam, Sreedhar y Bhagyalakshmi, 2008). Sin embargo; estos marcadores por su característica aleatoria tienen baja reproducibilidad. Esto concuerda con lo descrito por Orona *et al.*, (2004). En esta investigación los iniciadores contenían un promedio de 58% de relación GC y se detectó baja reproducibilidad al hacer dos repeticiones del ensayo de Barraganete.

Las condiciones de PCR (Morillo y Miño 2010), al igual que los reactivos utilizados, permitieron la amplificación con los oligonucleótidos RAPD para el genotipaje de las 80 accesiones de plátano “Dominico” y 40 de “Barraganete”. Por el contrario, fueron mejores las condiciones de amplificación (Onguso *et al.*, 2003) para los reactivos de INVITROGEN que por cuestiones de costos se dejaron de usar y se optó por aquellos preparados en el Laboratorio de Biotecnología de la EESC.

El producto de la amplificación alcanza un número de copias de 10^6 y puede ser visualizado con electroforesis después de teñirse el gel con bromuro de etidio tal como menciona Cerón (2010). Las amplificaciones gracias a la dominancia de los marcadores RAPD's (Quiroz, 2002) que detectan un alelo por locus se convirtieron en datos son de naturaleza binaria que se procesaron como presencia (1) – ausencia. (0). Los RAPD's por su carácter dominante (Peteira *et al.*, 2003) revelaron un solo locus y si se considera que el

plátano es una especie triploide, se puede asumir que en un locus pueden existir 3 alelos distintos, por ello el porcentaje de polimorfismo es elevado.

Diversidad genética

En cada división celular hay una pequeña probabilidad de que ocurra un cambio genético (Ertola, Yantorno y Mignone, *sf*) y conociendo que, tanto el plátano como el banano se originaron a partir de mutaciones espontáneas (García *et al.*, 2002), se analizó la variabilidad genética de *Musa* AAB del Banco de Germoplasma de la EELS., tomando en cuenta la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse (Mateu, 2004) aunque fenotípicamente sean similares.

La variabilidad genética de las accesiones de plátano se obtuvo gracias a la comparación intraespecífica de cada subcultivar, analizándose por agrupamiento de unidades de distancias mínimas propuesto por Nei y Li (1979) y promedios aritméticos con el método de agrupamiento UPGMA (Reyes *et al.*, 2003) para, que permitieron distinguir las diferencias genéticas existentes entre los 80 genotipos de “Dominico” y 40 de “Barraganete” (Ht 0,53 y 0,63 para “Dominico” y “Barraganete” respectivamente), similar a los resultados obtenidos por Venkatachalam, Sreedhar y Bhagyalakshmi (2008) con Ht promedio de 0,56 y Onguso *et al.* (2003) con Ht entre 0,6 y 0,68.

Para analizar ambos grupos como poblaciones independientes se consideró 1). El componente espacial que quizá pasa desapercibido pero que es influyente en el desarrollo de la planta. (Castañeda, Jaramillo y Cotes, 2010) y pudo seguramente influir en la buena producción de las accesiones de plátano que fueron seleccionadas para conservar en el Banco de Germoplasma. y 2). La interacción dinámica de adaptación con los factores (bióticos y abióticos) en los que crece una población que se traduce en la acumulación de la información genética que a manera de variantes cada especie va guardando entre los miembros de su población (Franco, 2003). La relativa homogeneidad en las poblaciones tanto de “Dominico” como de “Barraganete”, coincide con lo descrito por (Nadal, 2009). Las accesiones de cada grupo están estrechamente relacionadas y se encontraron dos

accesiones duplicadas en el cv. Barraganete. La consistencia de los grupos utilizando 100 repeticiones (bootstrapping) lo confirma. Las distancias genéticas entre las poblaciones analizadas fueron relativamente bajas y las poblaciones se agruparon (Figura 12), lo que se debe al alto parentesco entre los individuos estudiados.

Análisis de clusters

Los bajos niveles de confiabilidad observados según el enfoque comparativo por el análisis de remuestreo con reemplazo (Felsenstein, 1985), se atribuye al bajo número de ensayos RAPD realizados; sin embargo; esto no influyó en la caracterización genética de los materiales. Al comparar las relaciones genéticas entre los dos subcultivares agrupados por poblaciones, aunque la correlación entre ambos fue intermedia ($r = 0.8$ y 0.73 “Barraganete” y “Dominico” respectivamente) esta fue similar a la reportada en otro estudio con $r = 0.78$ por Crouch (2000).

Los porcentajes de diversidad genética obtenida en los análisis RAPD indican similitudes entre los taxones estrechamente relacionados reflejando sucesión de genes por el tipo de propagación de esta musácea, como señala Whithers (1992).

VI. CONCLUSIONES

La técnica molecular RAPD para la caracterización molecular de los subcultivares de plátano “Dominico” y “Barraganete”, fue eficiente para distinguir la variabilidad genética entre las accesiones de estos subcultivares.

Se identificaron grupos genéticamente similares dentro de las poblaciones

Los oligonucleótidos utilizados en el análisis de las accesiones del Banco de Germoplasma reportaron una variabilidad genética del 64%; a pesar de ser individuos fenotípicamente iguales.

El análisis de la diversidad genética intraespecífica entre las accesiones de plátano determinó un flujo génico homogéneo entre las poblaciones.

VII. RECOMENDACIONES

Hacer nuevas recolecciones de los subcultivares “Dominico” y “Barraganete” de ubicaciones geográficas más distantes con la finalidad de ampliar la posible diversidad genética existente en estas musáceas.

Emplear marcadores moleculares más informativos como los AFLP o SSR con la finalidad de obtener intervalos de confianza más elevados al momento de realizar los diferentes análisis genéticos.

Mejorar las condiciones de amplificación al trabajar con RAPD's para mejorar la resolución y evaluar su reproducibilidad.

Secuenciar las diferentes regiones del genoma de plátano Dominico” y “Barraganete” con la finalidad de asociar un perfil molecular a la alta producción en las especies estudiadas o a su vez en transformarlos en Marcadores SCARs.

VIII. RESUMEN

El presente estudio se realizó a través de marcadores moleculares RAPD's (*Random Amplified Polymorphic DNA*), para analizar 120 materiales de plátano (*Musa AAB*) (80 de "Dominico" y 40 de "Barraganete"), pertenecientes al Banco de Germoplasma *ex situ* de materiales élitos del Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas de la Estación Experimental del Litoral Sur "Dr. Enrique Ampuero Pareja" del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Los objetivos fueron generar información que contribuya a la identificación de genotipos superiores de plátano "Dominico" y "Barraganete"; determinar molecularmente la variabilidad genética de 80 clones de plátano "Dominico" y 40 de "Barraganete" existentes en la colección de la EELS mediante la técnica molecular RAPD's e identificar grupos genéticamente distintos dentro de las poblaciones de plátano de los cultivares en estudio.

De los 15 iniciadores utilizados en esta investigación, se seleccionaron 5 para analizar cada subcultivar. Las condiciones de la amplificación del ADN y el programa ensayado, fueron los recomendados por el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando una solución de TAE, teñidos con bromuro de etidio, visualizados y fotodocumentados.

Los decámetros fueron capaces de generar 37 y 32 bandas (Dominico y Barraganete respectivamente) con un 64% de polimorfismos. Con los datos generados se construyó una matriz de distancias genéticas. A partir del índice de Jaccard, representada en un dendrograma UPGMA se determinó un alto grado de semejanza intraespecífica $r = 0.8$ y 0.73 ("Barraganete" y "Dominico" respectivamente). Adicionalmente se realizó la comparación de matrices (bootstrapping).

IX. SUMMARY

This research was conducted using the molecular markers RAPD's (*Random Amplified Polymorphic DNA*) to analyze 120 accessions of plantains (*Musa* AAB) (80 of "Dominico" and 40 of "Barraganete"), belonging to the *ex situ* Germplasm Bank of National Program of Banana, Plantain and other Musaceae, located at the Experimental Station of the Southern Litoral "Dr. Enrique Ampuero Pareja" of INIAP.

The specific objectives were: 1) to generate information that contribute to the identification of superior genotypes of "Dominico" and "Barraganete"; 2). to determine the genetic variability of 80 clons of "Dominico" and 40 of "Barraganete" of the collection in EELS through RAPD molecular technique and 3). To identify genetically different groups in both plantain population of the cultivars "Dominico" and "Barraganete".

In this research 15 primers were used and 5 were selected to analyze each cultivar. The conditions of DNA amplification and the tested program were recommended by Biotechnology Laboratory of Santa Catalina Experimental Station of INIAP. The amplified products were subjected to electrophoresis in agarose gel 1,5% using the TAE buffer stained with ethidium bromide, visualized and documented

. The primers generated 37 and 36 bands (Dominico and Barraganete respectively) with 64% of polymorphisms. The genetic distances matrix were constructed with data generated. The UPGMA dendrogram using the Nei and Li index determined a high intraspecific similarity obtaining values of $r = 0,8$ and $0,73$ for "Barraganete" and "Dominico" respectively. Additionally a bootstrapping analysis was used to compare the originated matrix in both cultivars.

X. LITERATURA CITADA

AMORIM E., VIANA DOS REIS R., ALMEIDA DOS SANTOS J. y BATISTA V. 2008. Variabilidad genética estimada entre diplóides de banana por meio de marcadores microssatélites. EMBRAPA. Montes Claros, Brasil. 8p.

AZOFEIFA A. 2006. Uso de Marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del Trópico. Agronomía Mesoamericana. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. 17(2): 221-242

BAKER, A. 2000. Protein Electrophoresis.. En: Baker, A. J. (Ed.), Molecular Methods in Ecology. Blackwell-Science. Oxford. pp: 65-88

BBC. 2001. El banano del futuro. Periódico de la BBC. 19 de julio de 2001, Bush House, Strand, London. Disponible en: http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_1446000/1446858.stm.

BECERRA J. 1999. Caracterización fenológica del plátano dominico (AAB). Universidad Agraria del Ecuador. Milagro, Ecuador. 78 p.

BECERRA V. y PAREDES M. 2000 Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. Instituto de investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chile. Agric. Téc. v.60 n.3 Santiago Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072000000300007&script=sci_arttext

CANALES A., GÓMEZ U., PADILLA E. y SALADO J. 2004. Valoración de las propiedades cicatrizantes de la cáscara de plátano (*Musa paradisiaca*). In: XVI Reunión Internacional Acorbat 2004. Universidad de Colima Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Oaxaca, México, pp. 420-424. http://musalit.inibap.org/pdf/IN050320_es.pdf. Consultado el 14 de mayo de 2010.

CASTAÑEDA D., JARAMILLO D. y COTES J. 2010. Componentes de la variabilidad espacial en el manejo por sitio específico en banano. Universidad Nacional de Colombia. Pesquisa agropecuaria. Brasília, v.45:8, p.836-845

CLAROS, G. (2002). Marcadores Moleculares: Que son, como se obtienen y para qué sirven. Málaga, España. Consultado el 26 de abril del 2011. Disponible en <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>

CERÓN L. 2010. Caracterización de calabazas (*Cucurbita* spp.) mexicanas como fuente de resistencia al (CMV). Universidad Autónoma de Chapingo. México. 104 p.

CROUCH K. *et al.* 2000. Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., AAB group). Tag Theoretical and Applied Genetics. VOL. 101: 7

DANIELLS J., KARAMURA D., y TOMEKPE K. 2001. Musalogue. A catalogue of *Musa* germplasm. Diversity in the genus *Musa*. Montpellier: INIBAP, IPGRI. 207 p.

DADZIE, B. y ORCHARD J. 2003. Evaluación rutinaria de postcosecha de híbridos de plátanos y bananos: criterios y métodos. Guías técnicas INIBAP. 75p. Disponible en www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/235_ES.pdf. Consultado el 12 de Agosto de 2010.

DEMEY J., ZAMBRANO A., FUENMAYOR F. y SEGOVIA V. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. Caracas, Venezuela. INCI, ISSN 0378-1844, 28 (12): p 684-689.

EL-KHISHIN D., BELATUS E., EL-HAMID A. y RADWAN K. 2009. Molecular characterization of banana cultivars (*Musa* spp) from Egypt using AFLP. Agricultural

Genetic Engineering Research Institute (AGERI). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. Giza, Egypt. 5(3): 272-279.

ERTOLA R., YANTORNO O. y MIGNONE C. *sf.* Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA. Disponible: <http://www.biologia.edu.ar/microind/Seleccion,%20Mantenimiento%20y%20mejoramiento.htm#temario>. Consultado el 16 de Julio de 2011.

EMBRAPA. 2010. Extração de DNA de Plantas – MINIPREP. EMBRAPA. Soja. Londrina, Brazil. 1p

FAO. 2001. Contribución del banano a los ingresos, el empleo y la seguridad alimentaria en Ghana y el Ecuador. Grupo Intergubernamental sobre el banano y las frutas tropicales. San José, Costa Rica. Disponible en <http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/004/Y1871s.HTM> Consultado el 18 de mayo de 2010

FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenesis: An approach using the bootstrap. Consultado el 30 de agosto de 2011. Disponible en <http://molbiol.ru/forums/index.php?act=Attach&type=post&id=40284> University of Washington. Seattle. pp. 783 – 991

FERREIRA M. y GRATTAPAGLIA D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia. pp. 15, 16, 37-53.

FHIA. 2004. Informe Técnico 2003 Programa de Banano y Plátano. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. La Lima, Cortés, Honduras. 80 p.

FRANCO, T. L. e HIDALGO, R. 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.

FREIRE A. 2010. Optimización y automatización de PCR en tiempo real. Guayaquil, Ecuador. Comunicación personal. Conferencia 31 de marzo de 2010.

GALLO, L., MARCHELLI, P., AZPILICUETA, M. y CREGO, P. 2006. El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. *Bosque* Valdivia. 27(1): 3-15. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002006000100001&lng=es&nrm=iso. Consultado el 11 de Agosto de 2010.

GARCIA L. Pérez P, Bermúdez I, Orellana P, Veitía N, García L, Padrón Y y Romero C. *et al.* 2002. Estudio comparativo de la variabilidad producida por la inducción de mutaciones y el cultivo de tejidos en banano (*Musa* sp.) cv ‘Grande naine’. Revista Infomusa. Vol. 11-2 INIBAP. Francia. 110 p.

GONZÁLEZ DE LEÓN D. and FAURÉ. 1992. Genetic mapping of the banana diploid genome toward an integrated approach to the study of the *Musa* genome and the use of molecular marker technologies in *Musa* breeding. Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement. INIBAP. San José, Costa Rica. pp. 29 – 43.

GOODING p., BIRD C. y ROBINSON S. 2000. Actividad de la polifenol oxidasa y expresión génica en la fruta de los bananos Goldfinger (AAAB, FHIA-01). INFOMUSA — Vol. 10, N° 2. Francia. 6p.

HAMPL, V., VANACOVA. S., KULDA, J., and FLEGR, J. 2001. Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas* sp. BMC Evolutionary Biology 48: 1- 11.

INIBAP. 2005. Informe anual 2004. International Plant Genetic Resources Institute. Montpellier, Francia. pp. 11-13, 25.

JARAMILLO S., BAENA M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex-situ* de recursos filogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI). Grupo Américas. Cali, Colombia. pp. 60-67.

JUMBO M. 2010. Creación de un consorcio de exportación de pequeños productores de plátano Barraganete en El Carmen para la comercialización directa a Holanda en el periodo 2010-2019. Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito – Ecuador. 243 p.

KUMAR JAIN P., LAL SAINI M., PATHAK H. and KUMAR GUPTA V. 2007. Analysis of genetic variation in different banana (*Musa* spp.) variety using random amplified polymorphic DNA (RAPD's) 3p.

MAG. 2002. Censo Nacional Agropecuario (CNA). Disponible en <http://www.magap.gov.ec/censo/docs/nacionales/tabla12.htm>. Consultado el 18 de junio de 2010.

MARTÍNEZ, C., VILLARREAL, D., GEPTS, P., DELGADO, V., y GARCÍA, P. (2006). Structure and Genetic Diversity of Wild Populations of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Crop Science*: 46, 1071–1080.

MATEU I. 2004. Técnicas moleculares aplicadas al estudio de la conservación vegetal. Disponible: [www.uv.es/.../Técnicas%20\(moleculares\)%20de%20conservación/Tec%20moleculares%20cons%20veg.ppt](http://www.uv.es/.../Técnicas%20(moleculares)%20de%20conservación/Tec%20moleculares%20cons%20veg.ppt). Consultado el 05 de mayo de 2010.

MORALES L., ULLAURI M., DAVILA A. y FOLGUERAS M. 2009. Respuesta de genotipos mejorados de plátanos (*Musa* spp.) a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central de las Villas. Villa Clara, Cuba. 20 p.

Disponible:<http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5453/Publicaci%C3%B3nngenotipos.pdf>. Consultado el 10 de abril de 2010.

MORENO Y., MELGAREJO L., HERNANDEZ M., QUINTERO L. y VARGAS G. 2004. Caracterización molecular de un banco de germoplasma del género *Theobroma* mediante la técnica RAPD. Revista Colombiana de Biotecnología VOL. 6. 2. Colombia. p 15.24.

MORILLO E., y MIÑO G. 2010. Protocolos de marcadores moleculares. Estación Experimental Santa Catalina Departamento Nacional de Biotecnología (DNB). Quito, Ecuador. 30p.

NADAL R., MANZO G., OROZCO J., OROZCO M., y GUZMAN S. 2009. Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa* spp.) determinada mediante marcadores RAPD. Revista Fitotécnica Mexicana. Redalyc. México. 32 (1): 8.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

NEI M. AND LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76: 5269-5273.

NEI, M., AND KUMAR, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, Oxford. United Kingdom. pp 77-183.

ONGUSO J., KAHANGI E., NDIRITU D. and MIZUTANI F. 2003. Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers. Institute for Biotechnology Research. Nairobi, Kenya. 12 p.

ORONA F., PECINA V., ROCHA M., PARGA V., MARTÍNEZ O. y ALMEYDA I. 2004. Caracterización de variedades y líneas élite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México utilizando marcadores RAPD y SSR. Disponible en revistaphyton@fundromuloraggio.org.ar . Consultado el 16 de Junio de 2011. 12p.

ORTEGA N., KORNEVA S., RUIZ O., SANTOS E. y PERALTA E. 2010. Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de banano y plátano (*Musa* spp.) a partir de “meristemas apicales” y “scalps”. Escuela Superior Politécnica del Litoral. (CIBE) Guayaquil, Ecuador. 8 p. Disponible en: www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10971/1/Obtenci%C3%B3n%20de%20Multimeristemas%20y%20callos%20de%20diferentes%20variedades%20de%20banano.pdf. Consultado el 13 de agosto de 2010.

PAGE, R. D. 2000. TreeView. Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences University of Glasgow. Glasgow, Scotland. Disponible en <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> Consultado el 20 de Agosto 2011.

PANIS B. y TIEN THINH N. 2003. Crioconservación de germoplasma de *Musa*. Guías técnicas INIBAP Promusa. pp. 1-3.

PAREDES W. *sf*. Mejoramiento genético en plantas. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú. http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/mejora_genetica_plantas.html. Consultado el 28 de mayo de 2010.

PARRA O., CAYON D. y POLANIA J. 2009. Descripción morfoagronómica de materiales de plátano (*Musa* AAB, ABB) y banano (*Musa* AAA) cultivados en San Andrés Isla Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 11 p.

PETEIRA B., FINALET J., FERNANDEZ E., SANCHEZ I. y MIRANDA I. 2003. Caracterización de la variabilidad genética en *Musa* spp. Con la utilización de marcadores RAPD's, Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Cuba. 20p.

PRITCHARD J. and WEN W. 2003. Documentation for structure software: version 2. Department of Human Genetics University of Chicago. Chicago, USA.

QUIROZ J. 2002. Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. pp. 18 -22, 35-37.

RALLO, P., BELAJ, A., DE LA ROSA, y TRUJILLO, I.2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm

REYES A., LUNA J., ZAMORA V., MENDOZA R., FLORES A. and RODRÍGUEZ E. 2003. Phenology and genetic variability in mutants of apple cv. Golden Delicious in the Sierra of Arteaga, Coahuila, pp 121-127. Disponible en: www.uaaan.mx/DirInv/Resul_PI-04/MEMORIA/AReyes-2.doc. Consultado el 13 de abril de 2010.

ROMÁN M., ALONSO M. y BARRIOS A. *sf*. Marcadores de la variabilidad genética en el género *Musa*. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. Facultad de Biología. Cuba. 20 p. Disponible en: www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1047/cuf0103s.pdf. Consultado el 14 de Agosto de 2010.

SKROCH P. and NIENHUIS J. 1995 Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet*. Springer Verlag. Department of Horticulture, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA. 91:1086-1091

SWEENEN R. *et al.* 2009. Phenotypic Diversity and Patterns of Variation in West and Central African Plantains (Musa Spp., AAB group Musaceae). *Economy Botany journal*. Vol. 49:3. Consultado el 30 de agosto de 2010.

TAZÁN L. 2003. El cultivo de plátanos en Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría Regional del Litoral Sur y Galápagos. Editorial Raíces. Guayaquil, Ecuador. pp. 8-25.

THAWARO S. and TE-CHATO S. 2008. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) marker as a tool for hybrid oil palm verification from half mature zygotic embryoculture. Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla. 4(2): 165-176.

VALADEZ E. Y KAHL G. 2000. Huellas de ADN en genoma de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundiprensa SA. México. pp. 1-20, 40-48.

VENKATACHALAM L., SREEDHAR R., and BHAGYALAKSHMI N. 2008. The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. *Journal: Molecular phylogenetics and evolution*. Karnataka, India. 12 p.

Viruel, M. Y Hormaza, J. (2002). Development, characterization and analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae)

WENDT J. e IZQUIERDO J. 2002. Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Ecuador Fundación REDBIO Internacional con el apoyo de la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. 73 p. <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/pdf/ecuador.pdf>. Consultado el 10 abril 2010.

WHITHERS, L. (1992). Early detection of somaclonal variation. Proceeding of the Workshop on Biotechnology Applications for Bananas and Plantain Improvement, San José. 1:27-31.

WONG C., KIEW R., ARGENT G., SET OHN., KONG LEE S. and YUEN GAN Y. 2002. Assessment of the Validity of the Sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. Natural Sciences Academic Group, Nanyang Technological University, Edinburgh, UK. 12 p.

ZAMBRANO A. 2002. Método rápido, económico y confiable de, mini preparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Aragua, Venezuela. 6 p.
http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at5202/art/zambrano_a_nota.html. Consultado el 06 de mayo de 2010.

ANEXOS

Anexo 1. Procedencia de los clones del cv. “Barraganete” existentes en el Banco de Germoplasma de la EELS.

Código de campo	Fecha de Recolección	Procedencia	Fecha de siembra en la EELS		
			Planta1	Planta 2	Planta 3
PBPB 1	12/07/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010		
PBPB 2	12/07/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	15/01/2010	
PBPB 3	12/07/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	16/07/2010	
PBPB 4	12/07/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	20/05/2010	
PBPB 5	12/07/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	15/01/2010	20/05/2010
PBPB 6	15/08/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010		
PBPB 7	15/08/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	16/07/2010		
PBPB 8	27/09/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010		
PBPB 9	27/09/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	20/05/2010	20/05/2010	
PBPB 10	19/10/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	20/05/2010	16/07/2010	
PBPB 11	19/10/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	16/07/2010	
PBPB 12	30/11/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	15/01/2010	
PBPB 13	02/12/2009	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	15/01/2010	15/01/2010
PBPB 14	11/01/2010	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010		
PBPB 15	25/01/2010	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	16/07/2010	
PBPB 16	21/02/2010	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010	20/05/2010	
PBPB 17	21/02/2010	El Carmen (Darwin Astudillo)	20/05/2010	20/05/2010	16/07/2010
PBPB 18	15/02/2010	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010		
PBPB 19	15/02/2010	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010		
PBPB 20	22/04/2010	El Carmen (Darwin Astudillo)	15/01/2010		
PBPB 21*	12/07/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010		
PBPB 22	12/07/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	20/05/2010	20/05/2010
PBPB 23	12/07/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	15/01/2010	20/05/2010
PBPB 24	12/07/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	15/01/2010	15/01/2010
PBPB 25	12/07/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	15/01/2010	15/01/2010
PBPB 26	15/08/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	20/05/2010		
PBPB 27	15/08/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	15/01/2010	
PBPB 28	27/09/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010		
PBPB 29	27/09/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010		
PBPB 30	19/10/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	16/07/2010	16/07/2010	
PBPB 31	19/10/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	20/05/2010	20/05/2010	16/07/2010
PBPB 32	30/11/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	20/05/2010	16/07/2010
PBPB 33	02/12/2009	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	16/07/2010	
PBPB 34	11/01/2010	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	20/05/2010	20/05/2010	20/05/2010
PBPB 35	25/01/2010	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	16/07/2010	
PBPB 36	21/02/2010	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	15/01/2010	
PBPB 37	21/02/2010	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	15/01/2010	15/01/2010
PBPB 38	15/02/2010	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010	20/05/2010	16/07/2010
PBPB 39	15/02/2010	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010		
PBPB 40	22/04/2010	El Carmen (Ariolfo Cuadros)	15/01/2010		

* PBPB = Programa Banano y Plátano – “Barraganete”

Anexo 2. Procedencia de los clones del cv. “Dominico” existentes en el Banco de Germoplasma de la EELS.

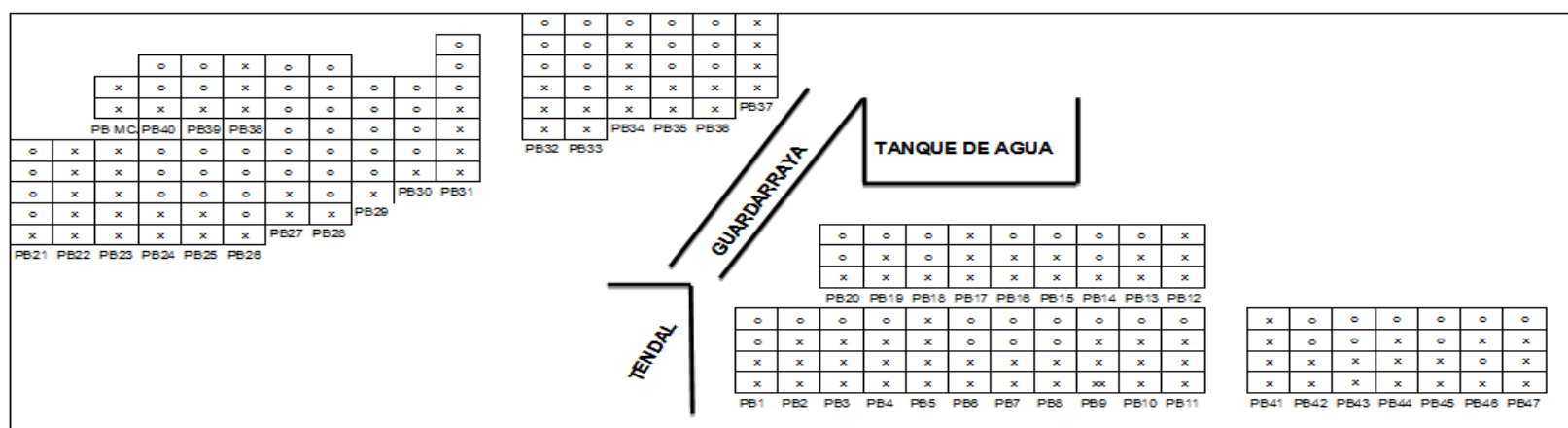
Código de campo	Fecha de Recolección	Procedencia (localidad/propietario)	Fecha de siembra en vivero
PBPD 1	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 2	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 3	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 4	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 5	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 6	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 7	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 8	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 9	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 10	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 11	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 12	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 13	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 14	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 15	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 16	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 17	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 18	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 19	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 20	17/06/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/06/2010
PBPD 21	05/07/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	07/07/2010
PBPD 22	05/07/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	07/07/2010
PBPD 23	05/07/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	07/07/2010
PBPD 24	19/08/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/08/2010
PBPD 25	19/08/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/08/2010
PBPD 26	19/08/2010	Playones (Leopoldo Zambrano)	19/08/2010
PBPD 27	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 28	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 29	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 30	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 31	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 32	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 33	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 34	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 35	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 36	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 37	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 38	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 39	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010
PBPD 40	19/08/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/08/2010

** PBPD = Programa Banano y Plátano – “Dominico”

...continuación del Anexo anterior.

Código de campo	Fecha de Recolección	Procedencia (localidad/propietario)	Fecha de siembra en vivero
PBPD 41	17/06/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/06/2010
PBPD 42	17/06/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/06/2010
PBPD 43	17/06/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/06/2010
PBPD 44	17/06/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/06/2010
PBPD 45	17/06/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/06/2010
PBPD 46	17/06/2010	Playones (Macario Cabrera)	19/06/2010
PBPD 47	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 48	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 49	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 50	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 51	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 52	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 53	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 54	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 55	17/06/2010	Playones (Flavio Zambrano)	19/06/2010
PBPD 56	17/06/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/06/2010
PBPD 57	17/06/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/06/2010
PBPD 58	17/06/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/06/2010
PBPD 59	17/06/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/06/2010
PBPD 60	17/06/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/06/2010
PBPD 61	05/07/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	07/07/2010
PBPD 62	05/07/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	07/07/2010
PBPD 63	05/07/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	07/07/2010
PBPD 64	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 65	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 66	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 67	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 68	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 69	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 70	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 71	19/08/2010	Roberto Astudillo (Reinaldo Ruiz)	19/08/2010
PBPD 72	19/08/2010	Roberto Astudillo (Carlos Chacón)	19/08/2010
PBPD 73	19/08/2010	Roberto Astudillo (Carlos Chacón)	19/08/2010
PBPD 74	19/08/2010	Roberto Astudillo (Carlos Chacón)	19/08/2010
PBPD 75	19/08/2010	Marcelino Maridueña (Paul Bajaña)	19/08/2010
PBPD 76	19/08/2010	Marcelino Maridueña (Paul Bajaña)	19/08/2010
PBPD 77	19/08/2010	Marcelino Maridueña (Paul Bajaña)	19/08/2010
PBPD 78	19/08/2010	Marcelino Maridueña (Paul Bajaña)	19/08/2010
PBPD 79	19/08/2010	Marcelino Maridueña (Paul Bajaña)	19/08/2010
PBPD 80	19/08/2010	Marcelino Maridueña (Paul Bajaña)	19/08/2010

Anexo 3. Croquis de campo del Banco de Germoplasma de la EELS

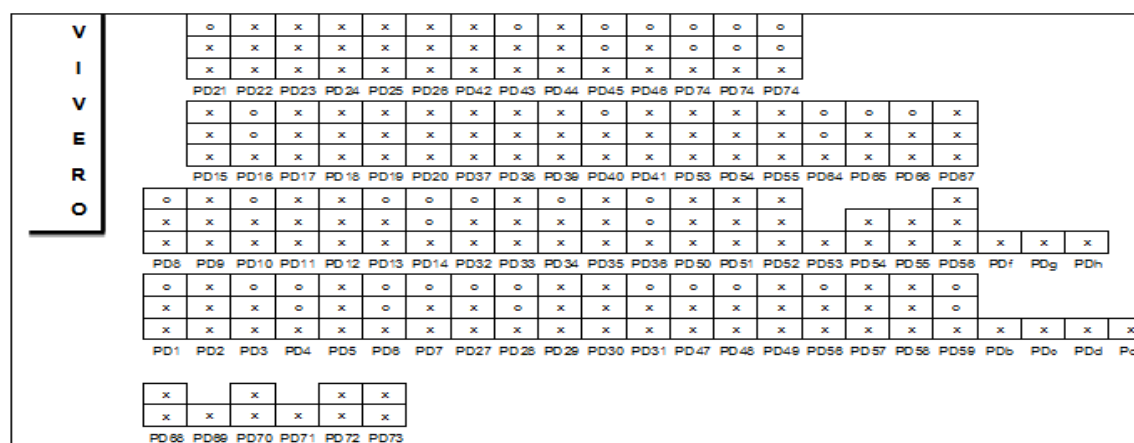


Lote 1, cv "BARRAGANETE"

CROQUIS DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE PLÁTANO
DOMINICO Y BARRAGANETE DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL
DEL LITORAL SUR "Dr. Enrique Ampuero Parra"

PROGRAMA NACIONAL DE BANANO, PLÁTANO Y
OTRAS MUSÁCEAS

Egda. María Eugenia Romero Román



Lote 2, cv "DOMINICO"

Anexo 4. Materiales requeridos para la caracterización molecular de plátano Dominico y Barraganete.

- | | |
|---|------------------------------------|
| • Balanza analítica | • Vasos de precipitación |
| • Balanza electrónica | • Morteros y pistilos |
| • Cepillos para lavado | • Papel aluminio |
| • Cinta de papel | • Parafilm |
| • Espátulas | • Peines |
| • Fundas plásticas para recolección | • Picetas |
| • Guantes de Nitrilo | • Pipetas |
| • Hieleras de espumaflex | • Puntas de 20 µl, 200µl y 1000 µl |
| • Hielo seco | • Rejillas |
| • Marcador permanente | • Separadores |
| • Matraces Erlenmeyer | • Tijeras |
| • Micropipetas 0 a 2 µl, 2 a 20 µl, 10 a 100µl, 100 a 1000µl, | • Tubos Corning |
| • Microtubos de 2; 1.5; 0.5 y 0.2 ml | • Tubos eppendorf |

Anexo 5. Reactivos necesarios para la caracterización a través de RAPD`s

- | | |
|---------------------------------|------------------------|
| • CTAB 2X | • Agua ultrapura |
| • EDTA | • ClNa |
| • Agua destilada | • PVP |
| • TRIS cloro | • β mercaptanol |
| • Buffer TAE 10X | • Persulfato de Amonio |
| • Cloroformo Alcohol Isoamílico | • DEPC |
| • Agarosa | • Mercaptoetanol |
| • Bromuro de Etidio | • RNAsa |
| • Taq | • TE |
| • dNTP's | • Buffer 5x |
| • Cloruro de Magnesio | • Oligonucleótidos |
| • BSA | |

Anexo 6. Equipos de Laboratorio

- | | |
|---------------------------------------|---|
| • Autoclave | • Fotodocumentador |
| • Baño María | • Fuente de poder |
| • Cámara de electroforesis horizontal | • Microcentrífuga Cole - Parmer |
| • cámara de flujo laminar | • Microcentrífuga refrigerada Eppendorf |
| • Cámara fotográfica | • Potenciómetro |
| • Destilador | |

- Qubit
- Refrigerador
- Sorbona
- Vórtex
- Termociclador Eppendorf
- Transiluminador UV
- Agitador magnético

Anexo 7. Protocolos de Extracción de ADN

a). Protocolo propuesto por Viruel y Hormaza (2002) para chirimoya modificado para plátano.

Tampón de extracción CTAB 2X:

Componentes	Cantidad (100 ml)	Concentración
Tris HCl 1M pH 8	10 ml	100 mM
NaCl	8.18 gr.	
EDTA 0.5M pH 8	4 ml	0.02 mM
CTAB	2 gr.	2%
Bisulfito sódico	0.1 gr.	0.1%

Cloroformo Alcohol Isoamílico CIA (24:1)

Para 100 ml

- ✓ 96 ml cloroformo (Triclorometano)
- ✓ 4 ml alcohol isoamílico

Buffer de lavado ADN

Para 100 ml

- ✓ 76 ml etanol 100%
- ✓ 24 ml H₂O

Procedimiento

1. Calentar en baño María a 65° C. (Poner el isopropanol y etanol 70% en el congelador).
2. Marcar debidamente los tubos Eppendorf (de acuerdo a la cantidad de muestras), vigilar durante el proceso que no se borren por la acción de los alcoholes utilizados.
3. Pesar aproximadamente 0.05 g. de hojas frescas sin nervaduras y ponerlas en un mortero, adicionar una pizca de meta bisulfito de sodio y triturar hasta obtener un polvo homogéneo.
4. Introducir el polvo obtenido en un tubo Eppendorf y añadir 750 µl de tampón de extracción CTAB y homogeneizar bien hasta obtener una papilla.

5. Añadir 2 µl de 2-mercaptoetanol en la campana de extracción de olores y mezclar en el Vórtex.
6. Incubar en el baño maría a 65° C durante media hora mezclando de vez en cuando por inversiones suaves (cada 10 minutos).
7. Luego de la incubación, agregar 750 µl de CIA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Mezclar por inversión hasta que las dos fases sean homogéneas, y una vez conseguido, mezclar en el Vórtex durante 2 minutos aproximadamente.
8. Centrifugar las muestras durante 15 minutos a 10000 rpm, de preferencia a 4° C.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio, aforar la muestra con buffer de extracción a 750 µl y añadir nuevamente 750 µl de CIA. Homogeneizar las muestras por inversión y mezclar en el Vórtex durante 2 minutos aproximadamente.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir lentamente 750 µl de isopropanol y mezclar suavemente. Invertir los tubos para mezclar completamente el contenido. Deberá observarse como hilos o una pelotilla (en caso contrario, se ponen las muestras a – 20° durante 30 minutos).

NOTA: Se pueden conservar las muestras hasta el siguiente día a 4° C

11. Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 5 minutos a 4° (en el fondo del tubo aparecerá un pellet de ADN). Quitar el sobrenadante y añadir 800 µl de tampón de lavado.
12. Dejar lavando durante 20 minutos por lo menos en la nevera.

NOTA: se pueden conservar las muestras hasta el día siguiente a 4° C.

13. Centrifugar 13000 r.p.m. durante 2 minutos a 4° C. Eliminar el sobrenadante y añadir 200 µl de etanol 70% a cada tubo y centrifugar a 13 000 rpm durante 2 minutos.
14. Eliminar el sobrenadante rápidamente y dejar secar boca abajo los tubos que contienen los *pellets*. Colocar las muestras en la micro estufa a 37° C por media hora o hasta que se haya eliminado completamente el olor a etanol.
15. Resuspender el pellet en TE (volumen depende del tamaño del pellet). Dejar en el frigorífico a 4° C hasta el siguiente día, o si se hace en el mismo día, disolverlo en el baño maría a 65° C durante 15 minutos. Posteriormente se incuba a 4° C durante 5 minutos.
16. Tratamiento con RNAsa (10 ng/µl) por cada 100 µl de ADN se coloca 1 µl de RNAsa. Dar un Vórtex y un punto de centrífuga. Colocar en la microestufa por media hora aproximadamente.
17. Conservar el ADN a 4° C.
18. Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.

b). Protocolo propuesto por el CIAT (1999), citado por Zambrano *et al.*, (2002).

1. Pulverizar con nitrógeno líquido tejido foliar joven recién cortado.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 µl y resuspender con 750 µl de buffer CTAB (2X), (2% de CTAB, 100 mM de tris base pH 8,0, 10 mM de EDTA y 0,7 M de NAC1 agregar agua hasta 500 ml y autoclavar). Adicionar 30 µl de 2-β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.
3. Agregar 300 µl de acetato de potasio (3 M, pH 4,8), mezclar suavemente e incubar en hielo por 15 min. Centrifugar 10 min. a 14 000 rpm y transferir el sobrenadante a otro tubo.
4. Adicionar 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente por inversión del tubo y centrifugar 10 min. a 14000 rpm.
5. Cuidadosamente pipetear la fase superior en tubo con 500 µl de Isopropanol frío para precipitar el ADN. Incubar en hielo durante 60 min.
6. Centrifugar en 5 min a 14000 rpm y descartar el sobrenadante.
7. Lavar el pellet de ADN dos veces con 500 µl de Etanol al 70% frío. Descartar el Etanol y permitir que el ADN se seque al aire libre por 30 min.
8. Resuspender el ADN en 30 a 50 µl de buffer TE (10 mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA pH 8,4) o agua estéril y almacenar a -20 °C.

c) Protocolo propuesto por EMBRAPA 2010 (portugués)

Extração de DNA de Plantas - MINIPREP

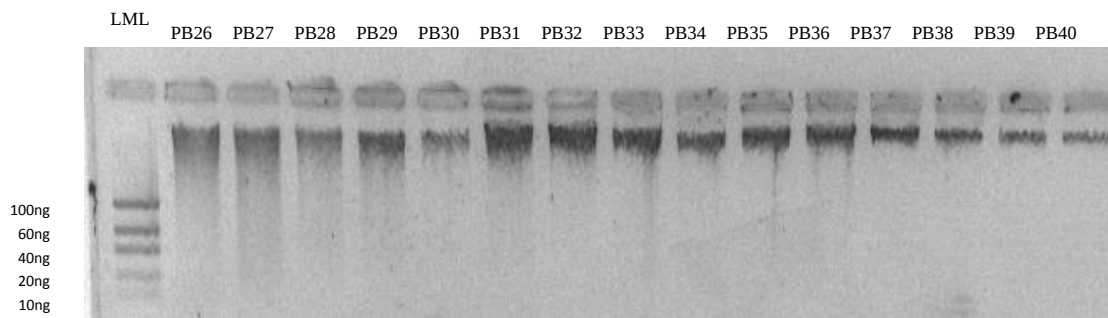
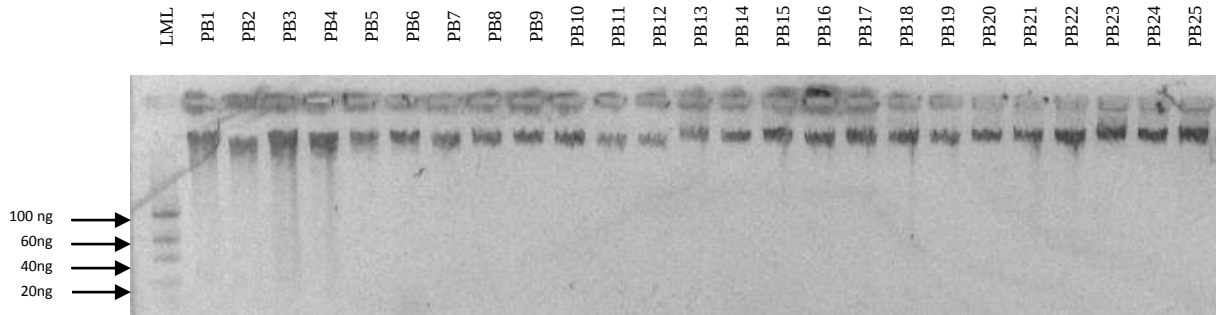
1. Triturar cerca de 1g de folha em presença de N₂ líquido em almofariz e transferir para tubos de microcentrífuga e adicionar tampão de extração na proporção de 4 vezes o volume da amostra.
2. Incubar a 65 °C por 60 minutos, agitando de vez em quando (cada 15min)
3. Resfriar e centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos. Transferir a fase aquosa (superior) para outro tubo.
4. Adicionar igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitar por suaves inversões por cerca de 5 minutos
5. Centrifugar a 6000 rpm por 15 minutos e transferir a fase superior para outro tubo.
6. Repetir os passos dois passos anteriores

7. Precipitar os ácidos nucleicos pela adição de isopropanol gelado (2/3 do volume). Misturar por inversões até os ácidos nucleicos tornarem-se visíveis e deixar over night a 4 oC ou 2 hora a -20 oC
8. Centrifugar a velocidade máxima por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e adicionar 500ul de etanol 70%. Centrifugar novamente por 5 min., descartar o sobrenadante e secar o pellet (O pellet pode ser sêco a vácuo ou deixar o tubo invertido sobre a bancada por cerca de 2 horas)
9. Ressuspender o pellet em 400ul de TE pH 8,0. Se necessário, pode-se aquecer a 65oC por 5 minutos para ajudar a ressuspensão.
10. Adicionar RNase A, na concentração final de 40ug/ml e incubar a 37oC por pelo menos 30 minutos.
11. Re-precipitar o DNA pela adição de 1/10 do volume de NaCl 5M e 2 vol. de etanol 95% gelado. Deixar over night a 4 oC ou a -20 oC por 2 horas
12. Repetir os dois passos anteriores a adição de RNase A . Quantificar o DNA em espectrofotômetro ou gel de agarose 0,8%.

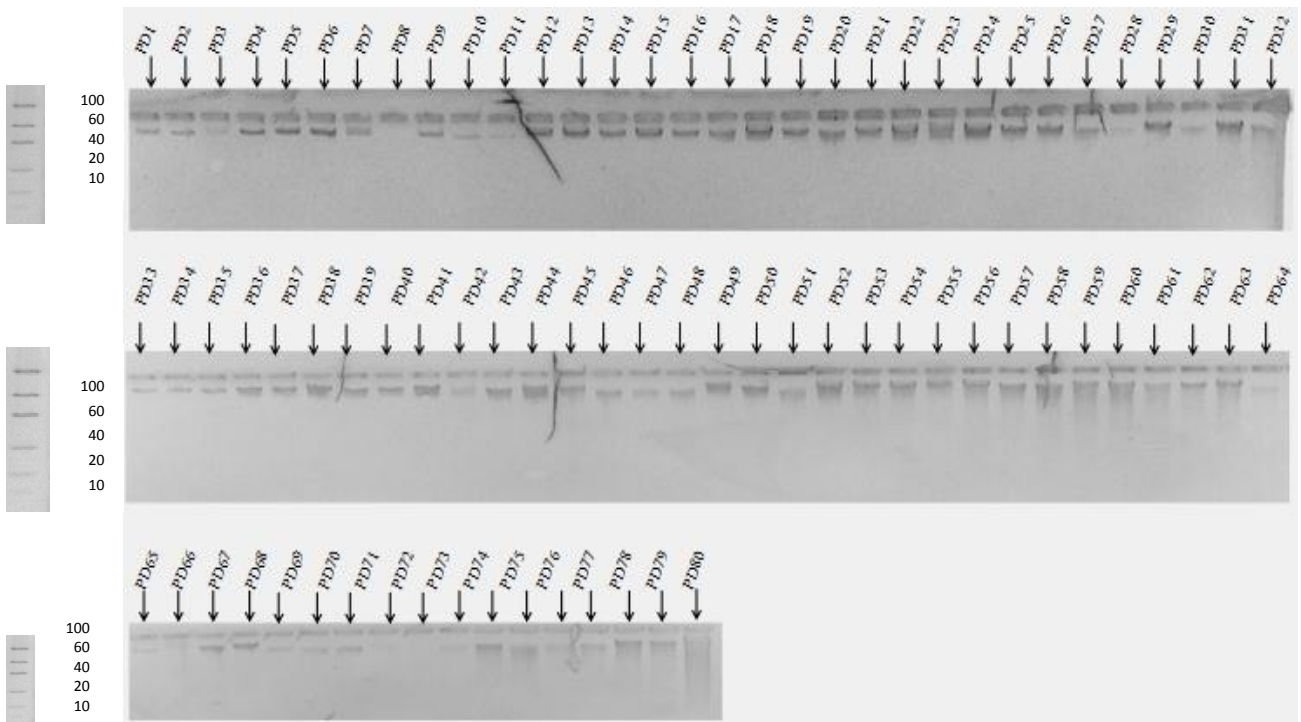
Componentes	Conc. Final	Vol. Final (10ml)
CTAB 5%	1%	2,0 ml
NaCl 5M	1,4 M	2,8 ml
Tris-HCl 1M pH 8,0	100 mM	1,0 ml
EDTA 0,5M	20 mM	0,4 ml
Mercaptoetanol	0,1%	0,01 ml
Água	----	3,7 ml
PVP	----	0,5 g.

Anexo 8. Test de integridad y cuantificación por comparacion visual de bandas

A. Barraganete



B. Dominico



Anexo 9. Resultados de Cuantificación por fluorimetría

CUANTIFICACIÓN DE ADN POR FLUOMETRÍA - barraganete				
Codigo	Lectura (ug/ml)	Concentración (ug/ml)	dilucion a 10 ng	
			ADN	AUP
1,2	3,44	172	2,9	47,1
2,2	3,4	170	2,9	47,1
2,6	2,07	103,5	4,8	45,2
3,4	3,93	196,5	2,5	47,5
4,3	4,54	227,0	2,2	47,8
5,1	4,51	225,5	2,2	47,8
5,3	3,31	165,5	3,0	47,0
6,3	5,6	280,0	1,8	48,2
7,1	3,01	150,5	3,3	46,7
8,4	3,23	161,5	3,1	46,9
9,3	2,28	114,0	4,4	45,6
10,3	3,6	180,0	2,8	47,2
10,4	3,75	187,5	2,7	47,3
11,1	3,1	155,0	3,2	46,8
11,3	2,12	106,0	4,7	45,3
12,2	3,52	176,0	2,8	47,2
13,3	0,439	22,0	22,8	27,2
14,2	3,08	154,0	3,2	46,8
15,2	2,25	112,5	4,4	45,6
16,1	7,6	380,0	1,3	48,7
16,2	5,3	265,0	1,9	48,1
17,3	4,9	245,0	2,0	48,0
18,3	2,98	149,0	3,4	46,6
19,2	2,4	120,0	4,2	45,8
22,2	2,51	125,5	4,0	46,0
24,4	4,75	237,5	2,1	47,9
25,3	5	250,0	2,0	48,0
28,2	5,25	262,5	1,9	48,1
29,1	3,61	180,5	2,8	47,2
31,2	4,67	233,5	2,1	47,9
32,4	0,434	21,7	23,0	27,0
33,3	3,47	173,5	2,9	47,1
34,3	1,56	62,4	16,03	83,97
35,3	2,84	113,6	8,80	91,20
36,3	3,64	145,6	6,87	93,13
37,3	4,05	162	6,17	93,83
38,3	1,22	48,8	20,49	79,51
39,2	3,29	131,6	7,60	92,40
40,3	3,94	157,6	6,35	93,65
41,2	2,81	112,4	8,90	91,10

CUATIFICACION POR FLUORIMETRÍA DE LAS ACCESIONES DE PLÁTANO DOMINICO

diluc 10 ng					Diluc. 10 ng				
Codigo	Lectura (ug/ml)	Concentracion (ug/ml)	ADN	AUP	Codigo	Lectura (ug/ml)	Concentracion (ug/ml)	ADN	AUP
PD 1	5,9	236	4,2	95,8	PD 41	3,71	148,4	6,7	93,3
PD 2	2,39	95,6	10,5	89,5	PD 42	2,12	84,8	11,8	88,2
PD 3	6,7	268	3,7	96,3	PD 43	2,97	118,8	8,4	91,6
PD 4	6,4	256	3,9	96,1	PD 44	2,3	92	10,9	89,1
PD 5	3,88	155,2	6,4	93,6	PD 45	6,6	264	3,8	96,2
PD 6	3,34	133,6	7,5	92,5	PD 46	2,97	118,8	8,4	91,6
PD 7	2,74	109,6	9,1	90,9	PD 47	6,3	252	4,0	96,0
PD 7,2	0,634	25,36	39,4	60,6	PD 48	8,9	356	2,8	97,2
PD 8	0,532	21,28	47,0	53,0	PD 49	1,65	66	15,2	84,8
PD 9	0,872	34,88	28,7	71,3	PD 50	3,14	125,6	8,0	92,0
PD 9,2	0,399	15,96	62,7	37,3	PD 51	4,66	186,4	5,4	94,6
PD 10	0,207	8,28			PD 52	5,1	204	4,9	95,1
PD 11	0,979	39,16	25,5	74,5	PD 53	8,9	356	2,8	97,2
PD 12	2,33	93,2	10,7	89,3	PD 54	6,7	268	3,7	96,3
PD 13	1,11	44,4	22,5	77,5	PD 55	7,2	288	3,5	96,5
PD 14	1,94	77,6	12,9	87,1	PD 56	3,5	140	7,1	92,9
PD 15	5	200	5,0	95,0	PD 57	0,139	5,56	179,9	79,9
PD 16	3,51	140,4	7,1	92,9	PD 58	3,15	126	7,9	92,1
PD 17	9	360	2,8	97,2	PD 59	2,68	107,2	9,3	90,7
PD 18	3,84	153,6	6,5	93,5	PD 60	4,88	195,2	5,1	94,9
PD 19	3,67	146,8	6,8	93,2	PD 61	5,6	224	4,5	95,5
PD 20	6,2	248	4,0	96,0	PD 62	4,46	178,4	5,6	94,4
PD 21	9,6	384	2,6	97,4	PD 63	3,28	131,2	7,6	92,4
PD 22	6,3	252	4,0	96,0	PD 64	2,16	86,4	11,6	88,4
PD 23	7,5	300	3,3	96,7	PD 65	1,06	42,4	23,6	76,4
PD 24	5,1	204	4,9	95,1	PD 66	7,2	288	3,5	96,5
PD 25	2,1	84	11,9	88,1	PD 67	2,81	112,4	8,9	91,1
PD 26	4,76	190,4	5,3	94,7	PD 68	2,1	84	11,9	88,1
PD 27	1,39	55,6	18,0	82,0	PD 69	1,77	70,8	14,1	85,9
PD 28	3,78	151,2	6,6	93,4	PD 70	6,4	256	3,9	96,1
PD 29	5,6	224	4,5	95,5	PD 71	3,96	158,4	6,3	93,7
PD 30	2	80	12,5	87,5	PD 72	3	120	8,3	91,7
PD 31	1,8	72	13,9	86,1	PD 73	2,62	104,8	9,5	90,5
PD 32	1,08	43,2	23,1	76,9	PD 74	2,53	101,2	9,9	90,1
PD 33	1,63	65,2	15,3	84,7	PD 75	0,21	8,4		
PD 34	2,89	115,6	8,7	91,3	PD 76	2,74	109,6	9,1	90,9
PD 35	3,4	136	7,4	92,6	PD 77	0,474	18,96	52,7	47,3
PD 36	2,61	104,4	9,6	90,4	PD 78	2,6	104	9,6	90,4
PD 37	5,8	232	4,3	95,7	PD 79	0,712	28,48	35,1	64,9
PD 38	4,02	160,8	6,2	93,8	PD 80	1,04	41,6	24,0	76,0
PD 39	3,92	156,8	6,4	93,6					
PD 40	5,6	224	4,5	95,5					

Anexo 10. Lista de iniciadores RAPD's y las secuencias respectivas, citados por Nadal, 2009*; Onguso, 2003**, Venkatachalam, 2008***

Iniciador	Secuencia
AA10*	5' AGACGGCTCC 3'
AA14*	5' AACGGGCCAA 3'
B17*	5' AGGGAACGAG 3'
H07*	5' CTGCATCGTG 3'
H08*	5' GAAACACCCC 3'
OPA-20**	5' GTTGCATCC 3'
OPC-02**	5' GTGAGGCGTC 3'
OPC-06**	5' GAACGGACTC 3'
OPC-08**	5' TGGACCGGTG 3'
OPC-13**	5' AAGCCTCGTC 3'
OPA-03***	5' AGTCAGCCAC 3'
OPA-04***	5' AATCGGGCTG 3'
OPA-11***	5' CAATCGCCGT 3'
OPC-04***	5' CCGCATCTAC 3'
OPC-05***	5' GATGACCGCC 3'

Anexo 11. Calculos con reducción de reactivos (Miño, 2010) para Selección de iniciadores con buffer 5x (EMBRAPA 2002) y Taq (Laboratorio de Biotecnología EESC, 2010)

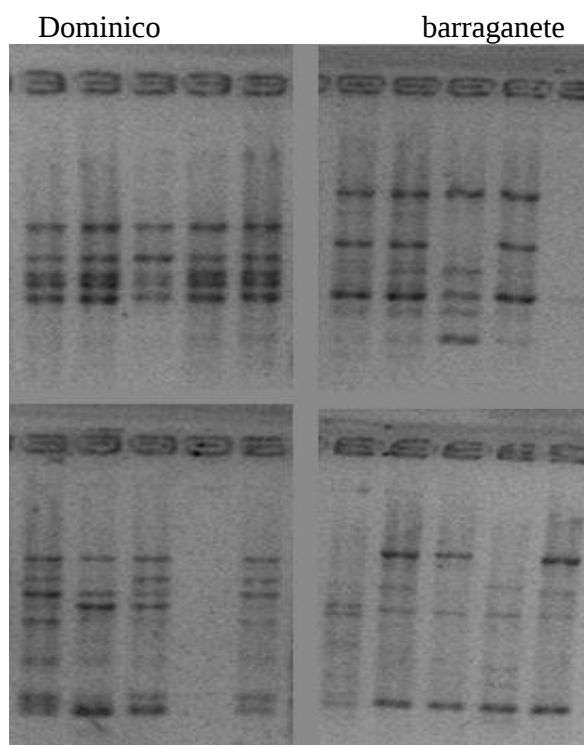
COCTEL MIX					
AUP	Buffer 5x	Iniciador	dNTP's	Taq	TOTAL
2,3	2,2	0,4	0,4	0,13	5,43
372,6	356,4	3,6	64,8	21,06	818,46

lista iniciadores por placa PCR			
1	AA 10	10	OPA 11
2	AA 14	11	OPA 20
3	B 17	12	OPC 02
4	H 7	13	OPC 03
5	H 8	14	OPC 04
6	OPA 03	15	OPC 05
7	OPA 04	16	OPC 08
8	OPA 07 *	17	OPC 13
9	OPA 08 *	18	OPW 17 *

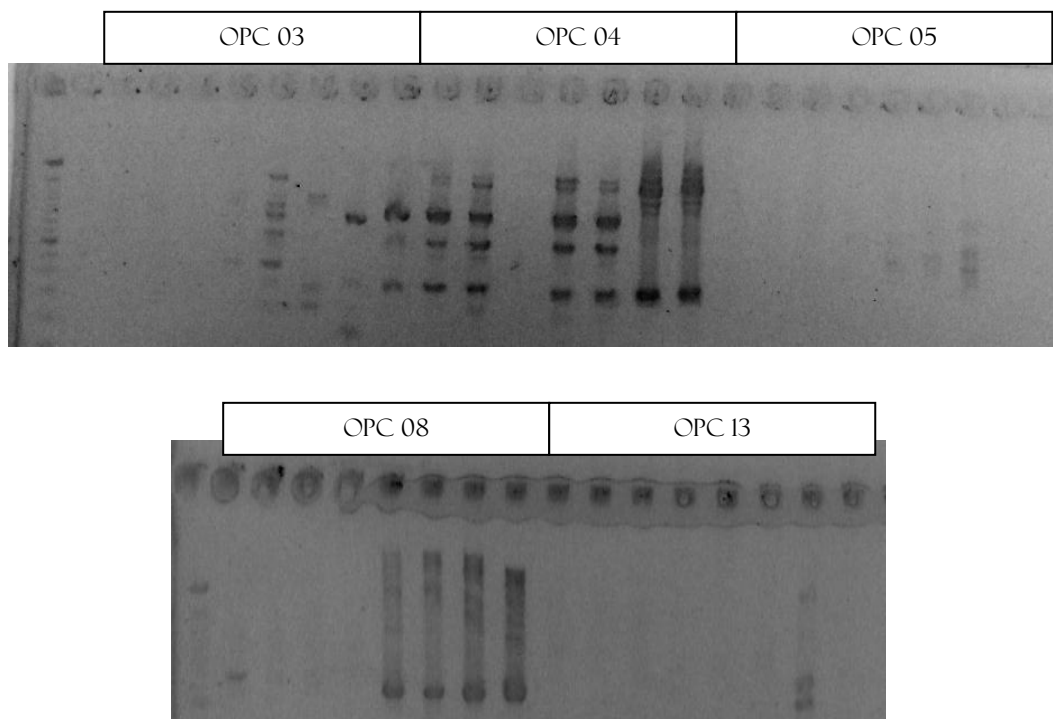
Genotipaje RAPD's (Dominico y Barraganete)

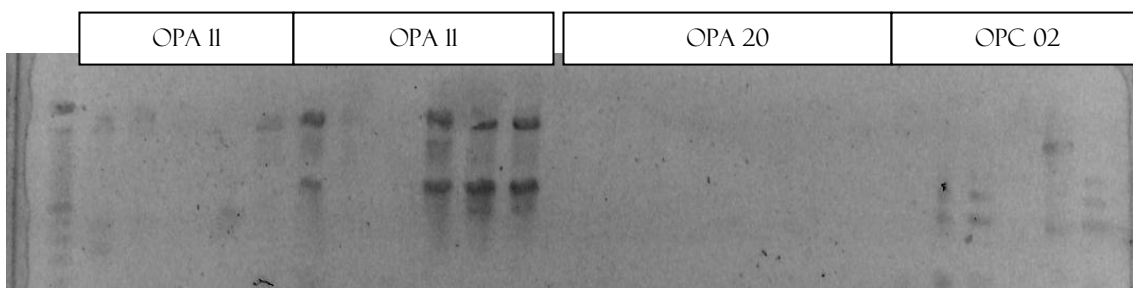
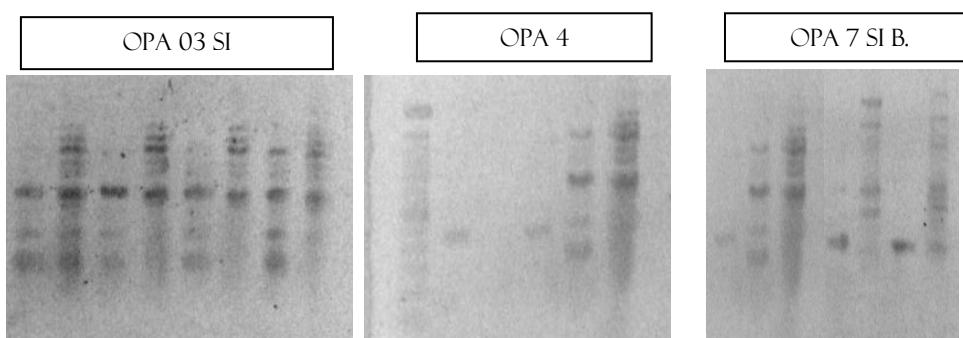
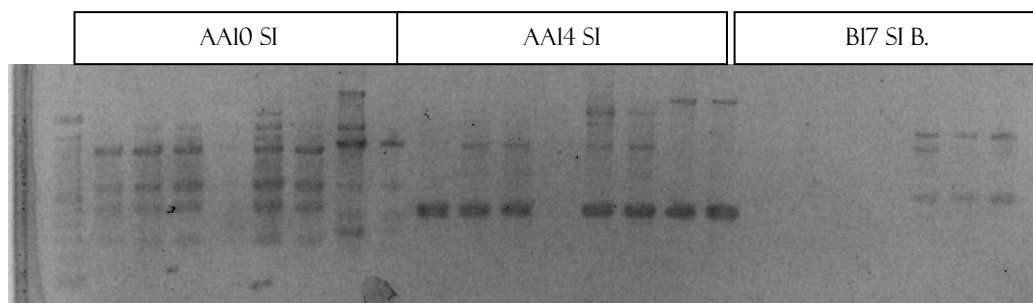
DATOS	
ADN's	Plátano
#muestras	9
# iniciadores	18

Anexo 12. Pre screening de 4 oligonucleótidos con 5 individuos (kit Taq INVITROGEN)

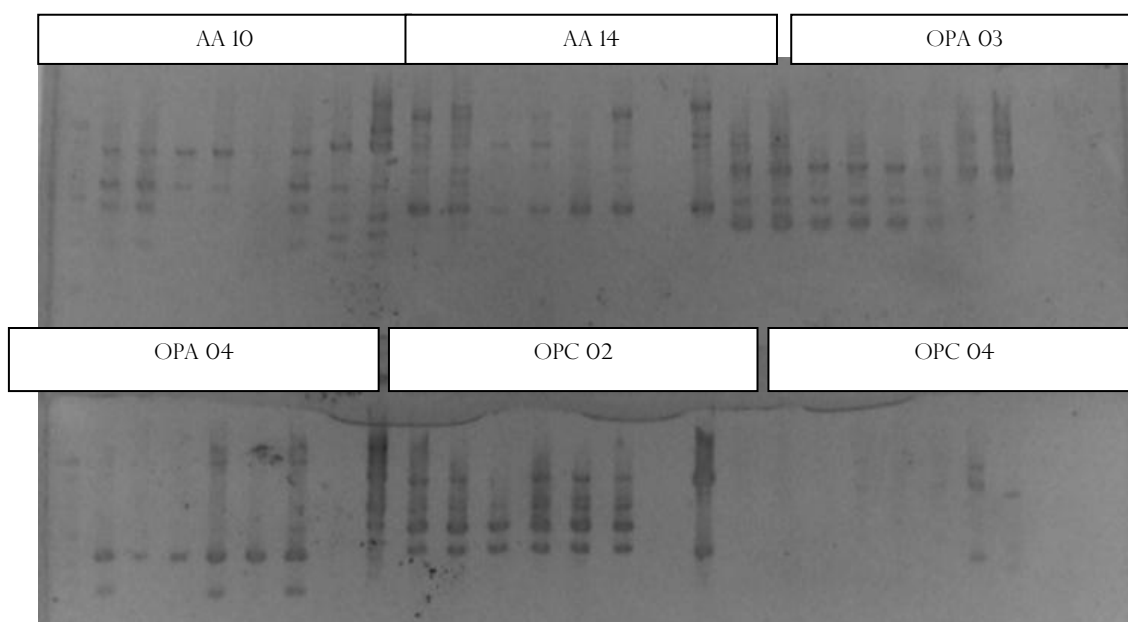


ANEXO 13. Screening de iniciadores RAPD's



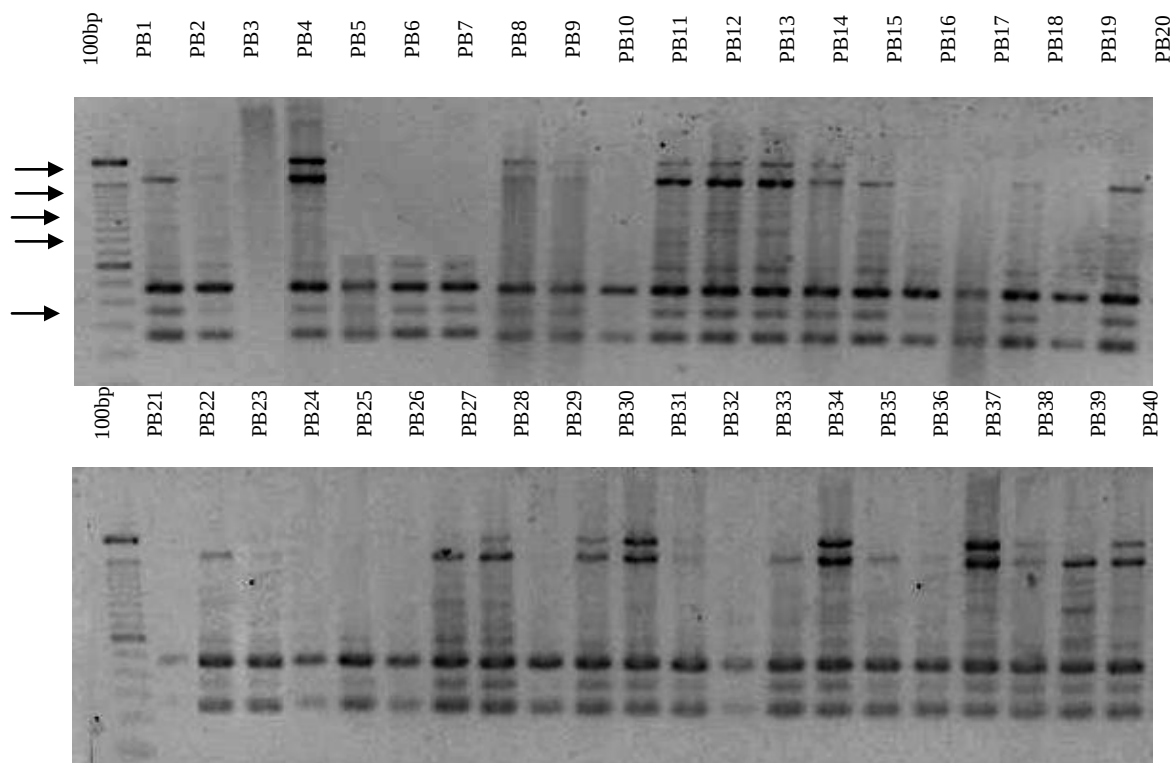


ANEXO 14. Screening RAPD's (Dominico)

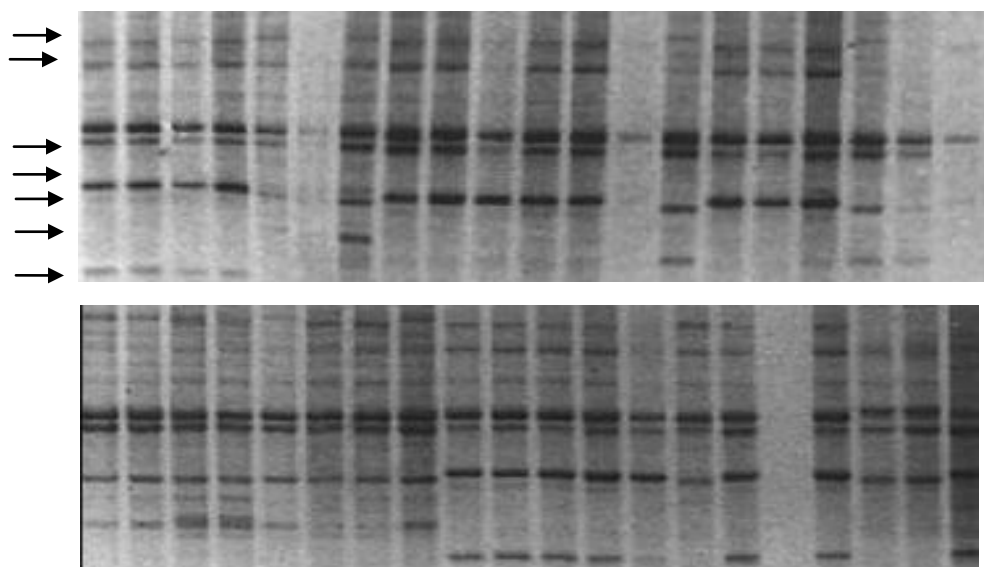


Anexo15. Amplificacion de 40 ADN's de barraganete con diferentes indicadores.

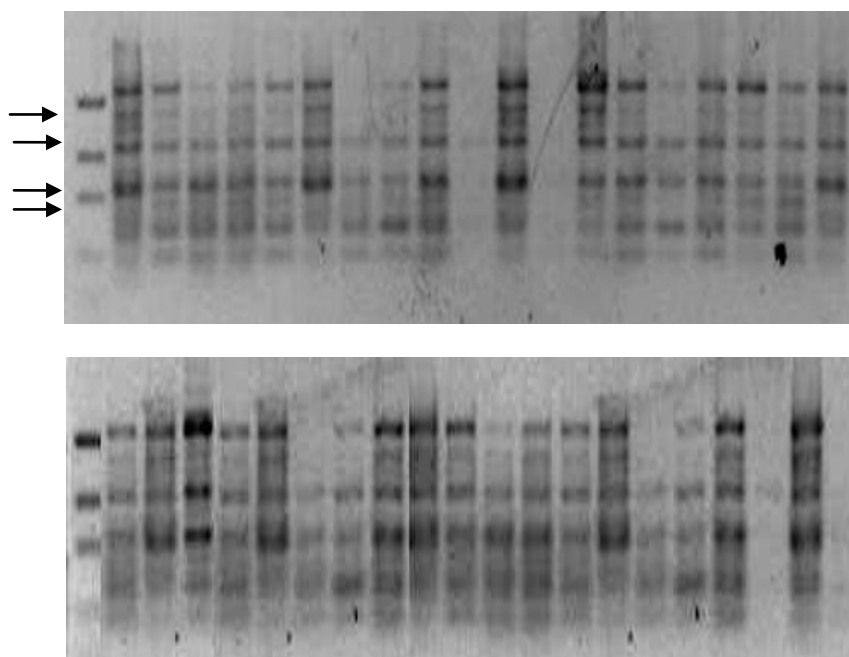
a). OPA11



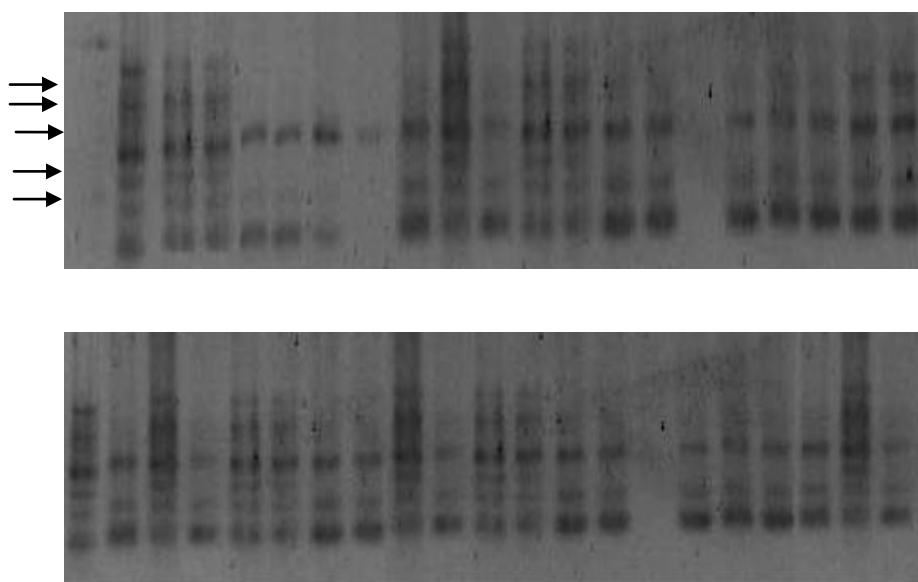
b). OPA 04



b). Iniciador AA14

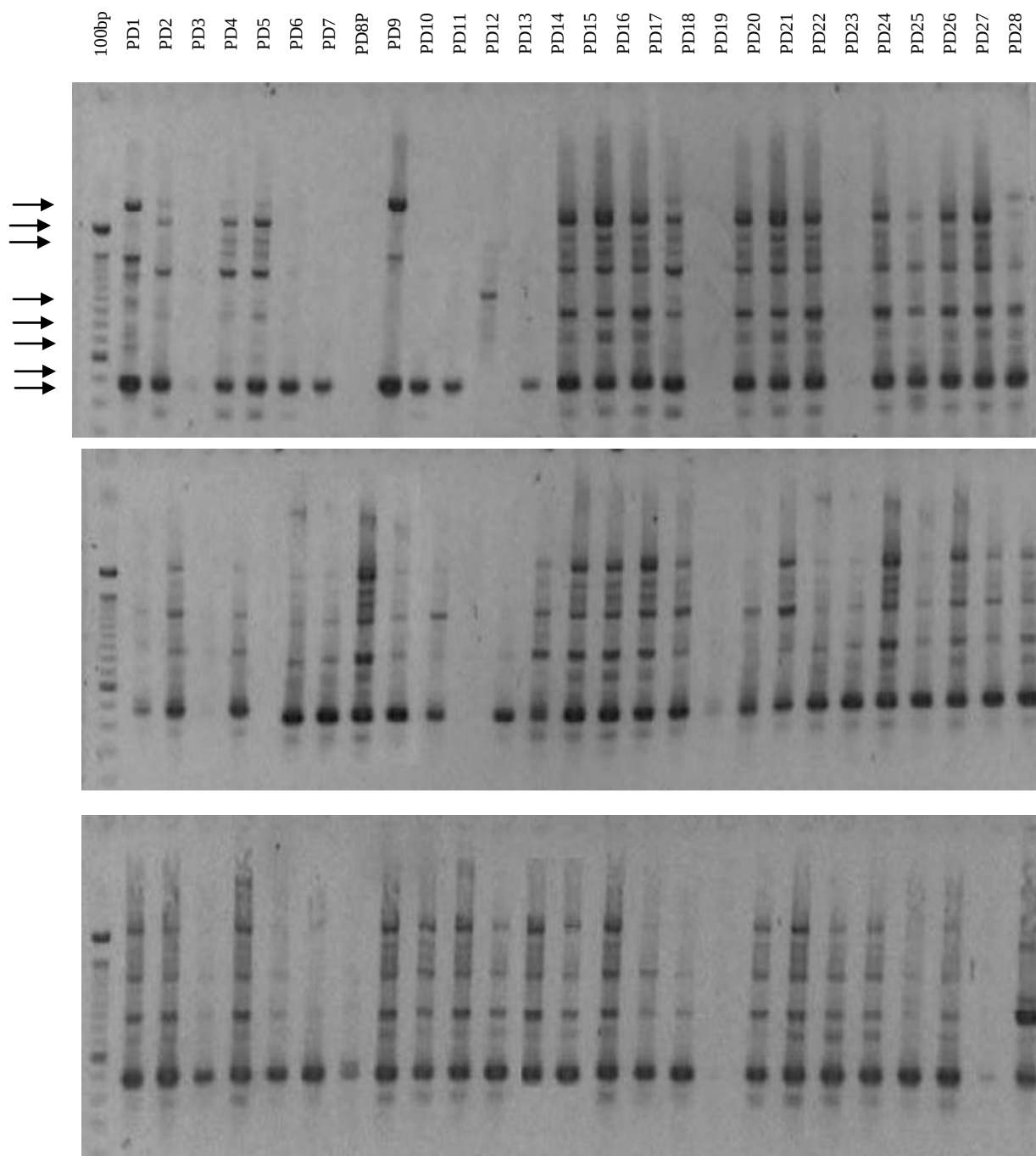


c) iniciador OPA 03

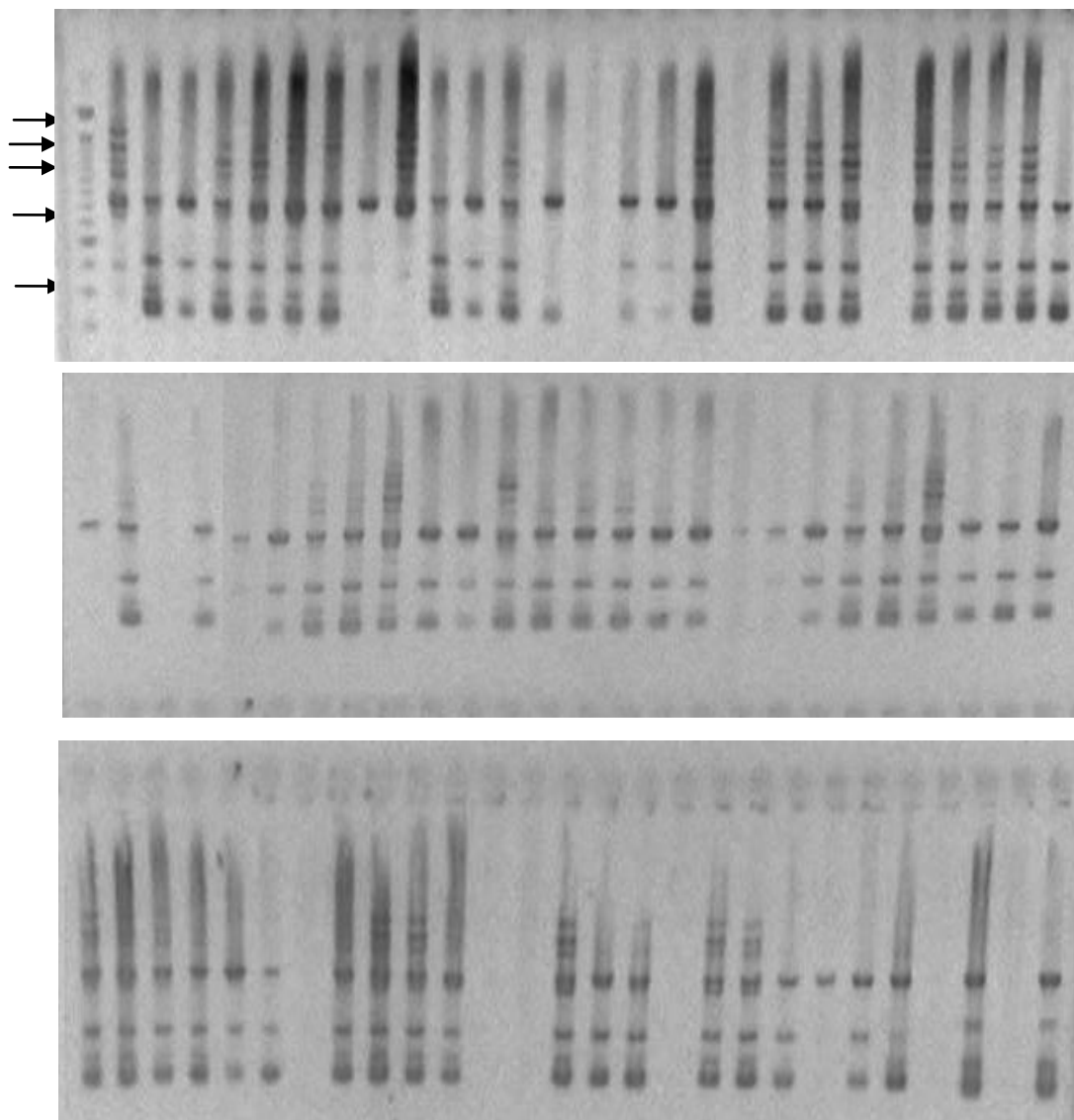


Anexo 16. Visualización en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación

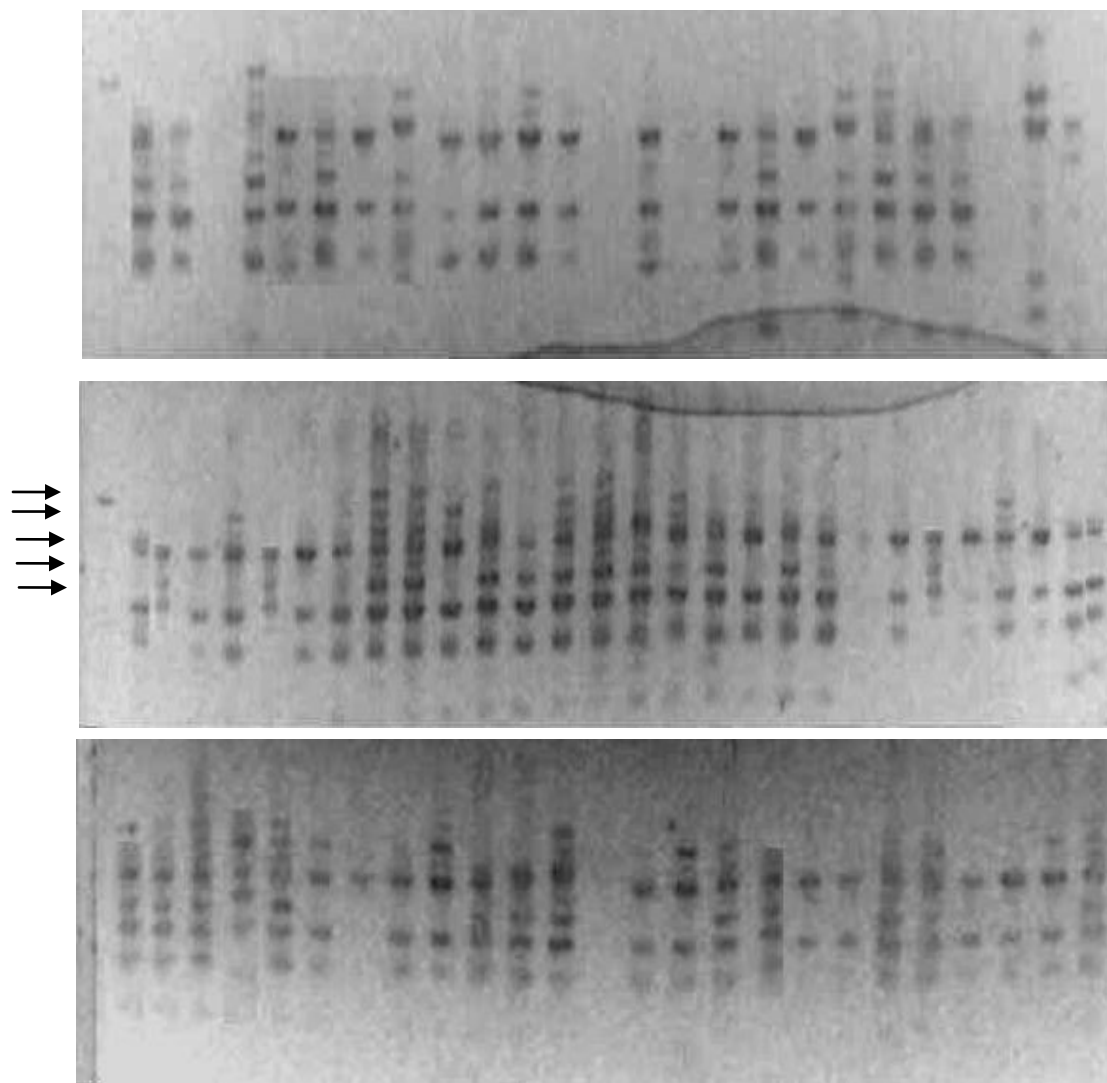
a). con el iniciador AA14 de Dominico



b). OPA3 Dominico



c) OPC 04 – Dominico



d) OPC02 - Dominico

