

**DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS RAPD EN MATERIALES DE *Musa* sp.
CON RESPUESTA DIFERENCIAL AL ATAQUE
DE *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum***

**DETECTION OF RAPD POLYMORPHISMS IN *Musa* sp.
MATERIALS WITH DIFFERENTIAL RESPONSE TO THE ATTACK
OF *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum***

Pi-Hsia Chen*, Efraín Salazar**, Hilda Fernández**, Luis Castro***, Antonio Russo**** y Sundry Vásquez**

*Ingeniero Agrónomo (Tesis UCV), **Investigadores, ***TSU Auxiliar de Laboratorio e ****Investigador contratado. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Unidad de Biotecnología Vegetal. Zona Universitaria, vía El Limón. Maracay, estado Aragua. Venezuela. Correo electrónico: efra63@gmail.com

RESUMEN

Para detectar la existencia de polimorfismos RAPD en materiales de *Musa* sp. con respuesta diferencial a *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, se evaluaron seis genotipos susceptibles (Pisang Awak, Cavendish Enano, Giant Cavendish, FHIA 17 proveniente del campo, FHIA 17 cultivado *in vitro*, FHIA 25) y dos tolerantes (BB y BBB). Se establecieron las condiciones de aislamiento y amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD). El ADN se aisló, la concentración se midió espectrofotométricamente y la pureza mediante las relaciones A260/A280 y A260/A230. Se utilizaron 27 iniciadores de Operon Technologies (20 secuencias de la serie OPA, 5 de la OPJ y 2 de la serie OPM). Se realizó un análisis de conglomerado jerárquico usando InfoStat Profesional, el método de agrupamiento de Ward y la distancia de Jaccard. Se obtuvieron patrones de bandas diferenciales para cada genotipo, identificándose seis bandas que distinguen los genotipos tolerantes (981 pb con el primer OPA-03, 630 pb con OPA-07, 630 pb con OPA10, 1725 pb con OPJ01, 580 pb con OPM20 y 630 pb con OPJ05). La serie OPA permitió observar mayores niveles de polimorfismo, con PICs entre 0,22 y 0,68. El análisis de conglomerado separó dos grupos principales, uno incluyó los genotipos con genoma A exclusivamente, y el otro, los genotipos con genoma B, a excepción del FHIA 17 *in vitro*. Hubo diferencias genéticas entre el FHIA 17 proveniente de campo y el cultivado *in vitro*.

Palabras Clave: Resistencia; *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*; RAPD; polimorfismos.

SUMMARY

To detect RAPD polymorphisms in *Musa* sp. with differential response to *Xanthomonas campestris* pv. *Musacearum* six susceptible genotypes (Pisang Awak, Dwarf Cavendish, Giant Cavendish, FHIA 17, FHIA17 *in vitro*, FHIA25) and two tolerant (BB and BBB) were evaluated. Conditions for DNA isolation and random amplification of polymorphic DNA (RAPD) were established. DNA was isolated according to Dellaporta *et al.* (1983), as amended by CIAT (2002), DNA concentration was measured spectrophotometrically. Additionally A260/A280 and A260/A230 ratios indicated the purity of the molecule. 27 Operon Technology primers (20 sequences in the series OPA, 5 from OPJ and 2 from OPM) were used. The statistical analysis was performed with a hierarchical cluster analysis using Infostat Professional version 2.0, Ward clustering method and the Jaccard distance. Specific band patterns were obtained for each genotype. Six bands were identified as unique for the tolerant genotypes (981 bp with OPA-03, 630 bp with OPA-07, 630 bp with OPA10, 1725 bp with OPJ01, 580 bp with OPM20 y 630 bp with OPJ05). OPA series allowed observation of higher levels of polymorphisms, having PIC values ranging 0.22 y 0.68. Hierarchical conglomerate analysis separated genotypes in 2 main groups, one including genotypes with the A genome exclusively, and the other with the B genome, except for FHIA 17 *in vitro*. There were genetic differences between FHIA 17 growing under field conditions and the one regenerated *in vitro*.

Key Words: Resistance; *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*; RAPD; polymorphisms.

RECIBIDO: octubre 15, 2011

APROBADO: septiembre 26, 2012

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos ocupan el cuarto lugar como el cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz, siendo las frutas de exportación de mayor importancia del planeta. Además de constituir el alimento básico para 500 millones de personas, representan una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. Se cultivan tanto en zonas tropicales como subtropicales, bajo diferentes sistemas, en 10 millones de hectáreas y en 120 países, con rendimientos entre 7 y 70 t ha⁻¹. Los países latinoamericanos y del Caribe producen el 90% del total de los plátanos y bananos que entran en el comercio internacional (FAO, 2004).

Pérez (2009) expresa que las musáceas son atacadas por un importante número de patógenos que limitan su desarrollo y productividad. Estos pueden moverse en virtud de sus mecanismos naturales de dispersión, pero es el movimiento de germoplasma y el comercio, la principal vía de transmisión. Se han identificado enfermedades exóticas que afectan a las musáceas y que son riesgos potenciales para Latinoamérica y El Caribe, entre las que se destacan:

- 1) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical (VCG 01213-01216), es un hongo fitopatógeno que causa la enfermedad de panamá, el cual se reportó en el 1989 en Australia, Asia y el Pacífico, donde ocasionó daños millonarios.
- 2) Cogollo racimoso del banano (siglas en inglés BBTV) y mosaico de las bracteadas del banano (siglas en inglés BBrMV). El BBTV es un nanovirus que está considerado entre las 10 especies invasoras de mayor importancia y el más nocivo en musáceas, así mismo, el BBrMV es un potyvirus que ha causado daños severos en Asia. Ambos se pueden distribuir aún en el intercambio de vitroplantas y se encontraron presentes en colecciones internacionales de germoplasma de musáceas.
- 3) Marchitez bacteriana por *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, descrito en *Musa* en el 2001 en África. Todos los clones de bananos son afectados. La transmisión por insectos y contacto con animales y trabajadores permite una rápida diseminación de la enfermedad.
- 4) Mancha rojiza del seudotallo del banano ocasionada por *Pseudomonas* spp., inicialmente informada en 1921 como *P. celebensis*, permaneció confinada a

Sulawesi (Bali, Indonesia) y las islas vecinas hasta finales de la década de 1980.

En *Musa*, los RAPD se utilizaron con diferentes objetivos (Williams *et al.*, 1990, 1993; Welsh y McClelland, 1990) siendo útiles para la identificación de genotipos AAB y ABB (Pillay *et al.*, 2000, 2001; Visser, 2001; Uma *et al.*, 2006). Asimismo, se pudo reconocer genomas AA, AAA, AAB, ABB y BB (Howell *et al.*, 1994; Thu *et al.*, 2002). Estos marcadores permitieron la identificación de variantes somaclonales (García y Giménez, 1999; Martin *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2006; Lakshmanan *et al.*, 2007), así como de enanismo en bananos del grupo Cavendish (Damasco *et al.*, 1996; Gubbuk *et al.*, 2004; Ramaje *et al.*, 2004).

De igual manera, Kaemmer *et al.* (1992) detectaron mutantes obtenidos mediante el uso de irradiación. En el caso de estudios de reacción a enfermedades en *Musa*, o establecimiento de polimorfismos entre genotipos con respuesta diferencial a patógenos, los RAPD han permitido la identificación de genotipos resistentes y susceptibles a la Sigatoka amarilla (Vidal y García, 2000), así como resistentes/tolerantes y susceptibles a *Fusarium oxysporum* (Javed *et al.*, 2004; Javed y Othman, 2005). Todo lo anterior confirma la utilidad de las técnicas de biología molecular en la identificación y caracterización de germoplasma de *Musa*, con énfasis en la selección de materiales tolerantes a patógenos.

El presente trabajo tuvo como objetivo general la identificación de polimorfismos entre patrones RAPD en materiales de *Musa* sp. con respuesta diferencial al ataque de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* con miras al establecimiento de un método efectivo de selección de materiales tolerantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Unidad de Biotecnología ubicada en el Campo Experimental, estado Aragua, Venezuela.

Se utilizó tejido foliar de plantas del género *Musa* pertenecientes a la colección de germoplasma del INIA-CENIAP. Para los fines del presente estudio la selección de los materiales se basó en los trabajos de Tripathi *et al.* (2004) y Tripathi y Tripathi (2009), donde se identificaron como materiales susceptibles los clones 'Pisang Awak'

(*Musa ABB*), Cavendish Giant (*Musa AAA*), Cavendish enano (*Musa AAA*), FHIA 17 (AAAA) y FHIA 25 (AABB). El material de FHIA 17 se obtuvo tanto de plantas creciendo en condiciones de campo, como regeneradas *in vitro* y el ADN de FHIA 25 se logró exclusivamente de plantas regeneradas *in vitro*. Como materiales tolerantes se seleccionaron un genotipo de *Musa balbisiana* (*Musa BB*) y un triploide con genoma balbisiana (*Musa BBB*).

El aislamiento del ADN se realizó según la metodología de Dellaporta *et al.* (1983) modificada por CIAT (1999), la cual tomaron 0,2 g de tejido foliar sin nervadura central y se le agregó 700 μL de Buffer de extracción CTAB 2% precalentado a 65 °C.

Las muestras se prepararon por 45 min a 65 °C en un termomixer Eppendorf a 1000 rpm para la agitación. Se agregaron 400 μL de acetato de potasio 5M y se colocaron en hielo por 30 min, previa agitación por inversión de los tubos. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 12000 rpm a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo y se agregaron nuevamente 400 μL de acetato de potasio 5M. Se centrifugaron las muestras nuevamente 5 min a 12000 rpm a una temperatura de 4 °C.

Posteriormente, se separaron en dos porciones iguales colocadas en tubos nuevos y se agregó un volumen igual de isopropanol (aproximadamente 400 μL) y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2. Las muestras se incubaron 45 min a -20 °C para la precipitación del ADN y se centrifugaron durante 10 min a 12000 rpm a una temperatura de 4 °C. Los pellets se lavaron con 500 μL de Etanol al 70% y luego se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se dejaron secar al aire libre los sedimentos. El ADN genómico se resuspendió en 100 μL de Buffer TE (Tris-EDTA) y se almacenaron a una temperatura de 4 °C.

Los ADNs aislados se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 0,8% para determinar su calidad y observar la integridad de la molécula. Como patrón de concentración se utilizó una solución 100 ng/ μL de ADN del bacteriófago Lambda; los geles fueron teñidos con una solución 0,05% de bromuro de etidio durante 10 min y visualizados bajo luz ultravioleta para su análisis. La concentración y pureza del ADN se analizaron electrofotométricamente utilizando el Nanodrop 1000 de Thermo, en el cual se obtuvo directamente la concentración del ADN en ng/ μL y las relaciones A260/A280 y A260/A230, quienes indicaron la pureza de la molécula aislada.

Las reacciones RAPD se realizaron en tubos de 0,2 ml de paredes delgadas, conteniendo 10 ng de ADN genómico, 1 unidad de Go Taq Polimerasa Flexi, 0,3 mM del iniciador, 3,0 μL de buffer de reacción (5X), MgCl_2 (1,33 mM), BSA (0,2 mg ml^{-1}), dNTPs (0,11 mM) en un volumen final de 15 μL . Se utilizaron 20 iniciadores de la serie OPA (Operon technologies).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PT-200 MJ research, con un paso inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos con 93 °C por 1 min, 36 °C por 30 seg y 72 °C por min y una extensión final a 72 °C por 7 min. Las reacciones se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la separación de estos productos de amplificación, realizadas en geles de agarosa 1,5% durante 90 min a 85-90 V con buffer TBE 0,5 X. Los productos de amplificación se visualizaron previa tinción con una solución de bromuro de etidio 0,000002% con el equipo Chemi-Doc de Biorad, mediante el Software Quantity One Versión 4.2.

Para cada iniciador se calculó el porcentaje de bandas polimórficas (%BP) y el contenido de información polimórfica (siglas en inglés PIC) según la metodología de Roldán-Ruiz *et al.* (2000). Se obtuvieron los patrones de bandas característicos para cada genotipo estudiado y se hizo un análisis descriptivo de los patrones encontrados, con el propósito de establecer semejanzas o diferencias entre los genotipos A (susceptibles) y los genotipos B (resistentes). Adicionalmente, se hizo un análisis de conglomerado jerárquico utilizando el programa Infostat Profesional versión 2.0, con el método de agrupamiento de Ward y la distancia de Jaccard.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología de extracción del ADN utilizada fue efectiva, rápida y sencilla, para el aislamiento de moléculas con concentración y pureza suficientes para la realización de las pruebas RAPD (Cuadro 1). Los valores menores de la concentración de ADN aislado se obtuvieron en las muestras provenientes de condiciones de crecimiento *in vitro*. Sin embargo, la calidad, pureza y concentración de las moléculas es apta para la amplificación al azar.

Casi la totalidad de las muestras presentaron valores de la relación A260/A280 entre 1,8 y 2,0 lo cual sugiere que el ADN aislado está libre de proteínas y puede considerarse puro. Los dos valores fuera del rango, indican la presencia de proteínas en la muestra con el

valor menor, y probablemente existan problemas con la concentración de carbohidratos, que puedan explicar los valores superiores de 2,21.

CUADRO 1. Concentración en ng/μl y pureza del ADN aislado a partir de tejido foliar de ocho clones de *Musa*.

Clones	Concentración (ng/μl)	Pureza (Relación 260/280)
Pisang Awak (AAB)	201,90	1,84
FHIA 17C (AAAA)	130,05	1,88
Cavendish Giant (AAA)	164,76	2,00
Cavendish Enano (AAA)	128,07	2,21
BB	272,19	1,99
BBB	184,65	1,95
FHIA 17IV (AAAA)	38,07	1,80
FHIA 25 (AABB)	99,84	1,60

De los 27 iniciadores analizados, se obtuvo amplificación en 25 de ellos. Solo los iniciadores OPA 17 y OPM05 no produjeron ningún producto de amplificación. Se logró amplificar un total de 337 bandas RAPD, de las cuales un 75,93% en promedio resultaron ser polimórficas, con una reproducibilidad del 100%.

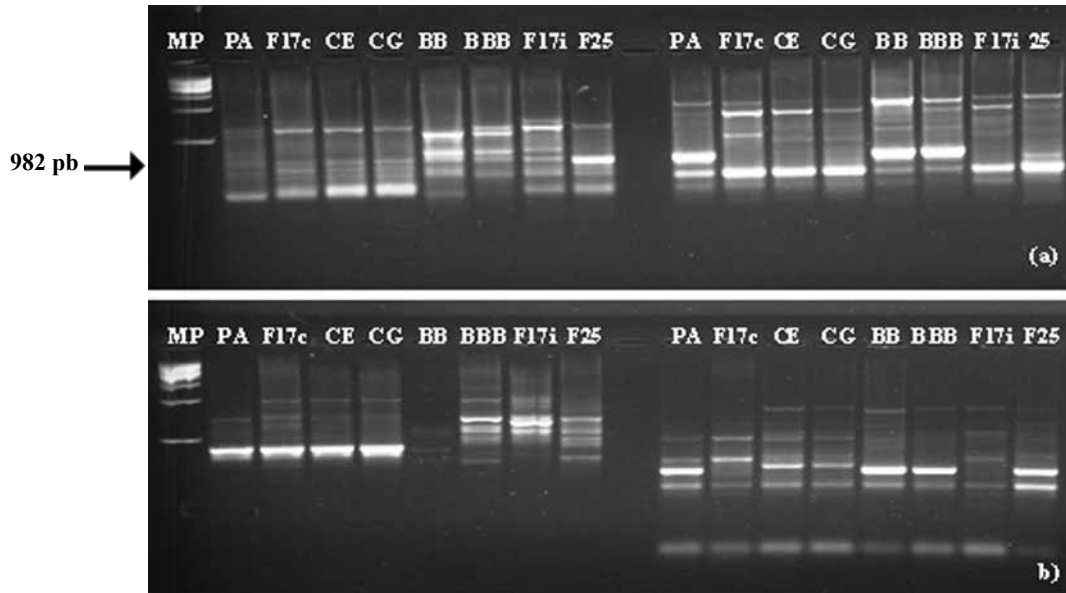
En el Cuadro 2 se presentan los porcentajes de bandas polimórficas obtenidos y el PIC para cada uno de los iniciadores analizados. Los resultados arrojan un alto poder discriminatorio entre los iniciadores utilizados.

Se evidencia un alto grado de polimorfismo entre los ocho genotipos estudiados (Figura 1a y 1b). Todos los iniciadores utilizados fueron capaces de establecer polimorfismos entre los materiales de *Musa* estudiados. El primer OPA03 permitió la formación de un producto de amplificación de 982 bp (Figura 1a), presente exclusivamente en los materiales tolerantes a *X. campestris* pv. *musacearum*.

CUADRO 2. Porcentaje de bandas polimórficas y contenido de información polimórfica asociados a los 27 iniciadores utilizados para la caracterización molecular de ocho genotipos de *Musa* con respuesta diferencial al ataque de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*

	# bandas	NBP	%BP	PIC
OPA-01	10	10	100,00	0,41
OPA-02	9	8	88,89	0,39
OPA-03	12	12	100,00	0,43
OPA-04	12	11	91,67	0,32
OPA-05	7	7	100,00	0,34
OPA-06	5	5	100,00	0,38
OPA-07	9	9	100,00	0,39
OPA-08	11	11	100,00	0,45
OPA-09	7	3	42,86	0,17
OPA-10	19	19	100,00	0,37
OPA-11	16	16	100,00	0,33
OPA-12	11	11	100,00	0,27
OPA-13	11	9	81,82	0,24
OPA-14	12	12	100,00	0,38
OPA-15	5	5	100,00	0,39
OPA-16	5	4	80,00	0,68
OPA-17	0	0	0,00	0,00
OPA-18	7	7	100,00	0,41
OPA-19	10	10	100,00	0,33
OPA-20	7	7	100,00	0,22
OPJ-01	15	2	13,33	0,37
OPJ-02	25	9	36,00	0,07
OPJ-03	25	1	4,00	0,22
OPJ-04	17	7	41,18	0,13
OPJ-05	46	44	95,65	0,33
OPM-05	0	0	0,00	0,00
OPM-20	24	14	58,33	0,16

NBP= Número de bandas Polimórficas, %BP= porcentaje de bandas polimórficas, PIC= Contenido de Información Polimórfica.



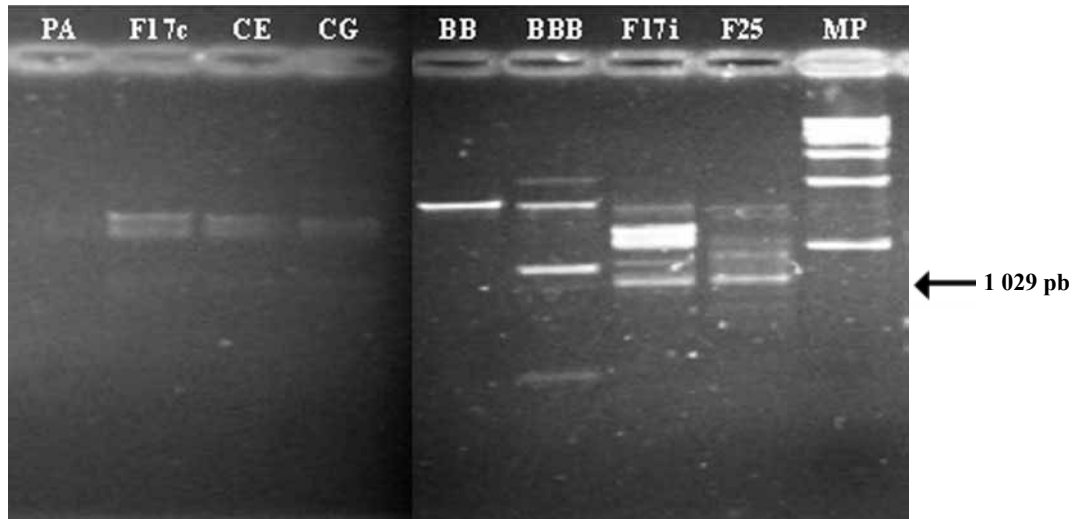
MP= Marcador de peso molecular 1kb ladder; PA= Pisang Awak; F17c= FHIA 17 campo; CE= Cavendish Enano; CG= Cavendish Gigante; BB= Musabalbisiana; BBB= Triploide Balbisiana; F17i= FHIA 17 *in vitro*; F25= FHIA 25 *in vitro*.

FIGURA 1. (a) Fragmentos de amplificación obtenidos con los iniciadores OPA03 Y OPA04, respectivamente. (b) Fragmentos de amplificación obtenidos con los iniciadores OPA01 Y OPA02, respectivamente.

En el mismo orden de ideas, Jhaved *et al.* (2004) reportaron un producto de amplificación del primer OPA03 de aproximadamente 400 bp como relacionado a la susceptibilidad a *Fusarium oxysporum*. De lo anterior, se deduce que el primer OPA03 aparece como una

herramienta potencial para la selección de materiales de *Musa* tolerantes a enfermedades.

De igual modo, el primer OPA07 permite la amplificación de un fragmento de 1029 bp (Figura 2) presente exclusivamente en los materiales susceptibles a *X. campestris* pv. *musacearum*.



MP= Marcador de peso molecular 1kb ladder; PA= Pisang Awak; F17c= FHIA 17 campo, CE= Cavendish Enano; CG= Cavendish Gigante; BB= Musabalbisiana; BBB= Triploide Balbisiana; F17i= FHIA 17 *in vitro*; F25= FHIA 25 *in vitro*.

FIGURA 2. Fragmentos de amplificación obtenidos con el primer OPA07.

Adicionalmente, se identificó en los genotipos tolerantes una banda de 630 bp con el iniciador OPA10, una banda de 1725 bp con el iniciador OPJ01, otra de 580 bp con el primer OPM20 y la siguiente de 630 bp con el primer OPJ05. Las bandas identificadas se presentan como elementos potenciales para la selección de individuos con tolerancia a *X. campestris* pv. *musacearum* y se recomienda afinar los estudios con estos dos posibles marcadores, a fin de establecer la verdadera correlación de estos productos de amplificación RAPD con la tolerancia al patógeno.

En general se observó que los iniciadores de la serie OPA tienen mayor poder de discriminación que los de las otras series analizadas, evidenciado por un mayor número de bandas polimórficas producidas y un mayor PIC. De los iniciadores que permitieron amplificar bandas específicas para los genotipos tolerantes, todos excepto OPJ01 y OPM 20 pueden considerarse como generadores de un alto grado de polimorfismo debido a que presentan porcentajes de bandas polimórficas superiores al 90%. Los primers evaluados a excepción de OPM20 presentaron rangos de PIC entre 0,33 y 0,43. Valores similares

de PIC fueron mencionados por Salazar *et al.* (2006) con los primers OPA01, OPA02 y OPA 19 analizando germoplasma de ajonjolí.

En el caso de RAPD en *Musa*, los valores PIC coinciden con los señalados por Zambrano *et al.* (2007) para los primers 10 mer utilizados. Sin embargo, el número de bandas polimórficas generadas fue mucho menor que los encontrados en el presente trabajo utilizando primers de la serie OPA. Del mismo modo, Nadal-Medina *et al.* (2009) encontraron niveles de polimorfismo superiores al 90% analizando genomas de bananos con los primers de la serie OPA, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio.

El análisis de conglomerado jerárquico permitió la separación de los materiales en dos grandes grupos (Figura 3), uno de los cuales estuvo formado exclusivamente por genotipos con el genoma A. Los materiales con el genoma B estuvieron siempre ubicados en el mismo subgrupo, cercanos al clon Pisang Awak con genoma (ABB).

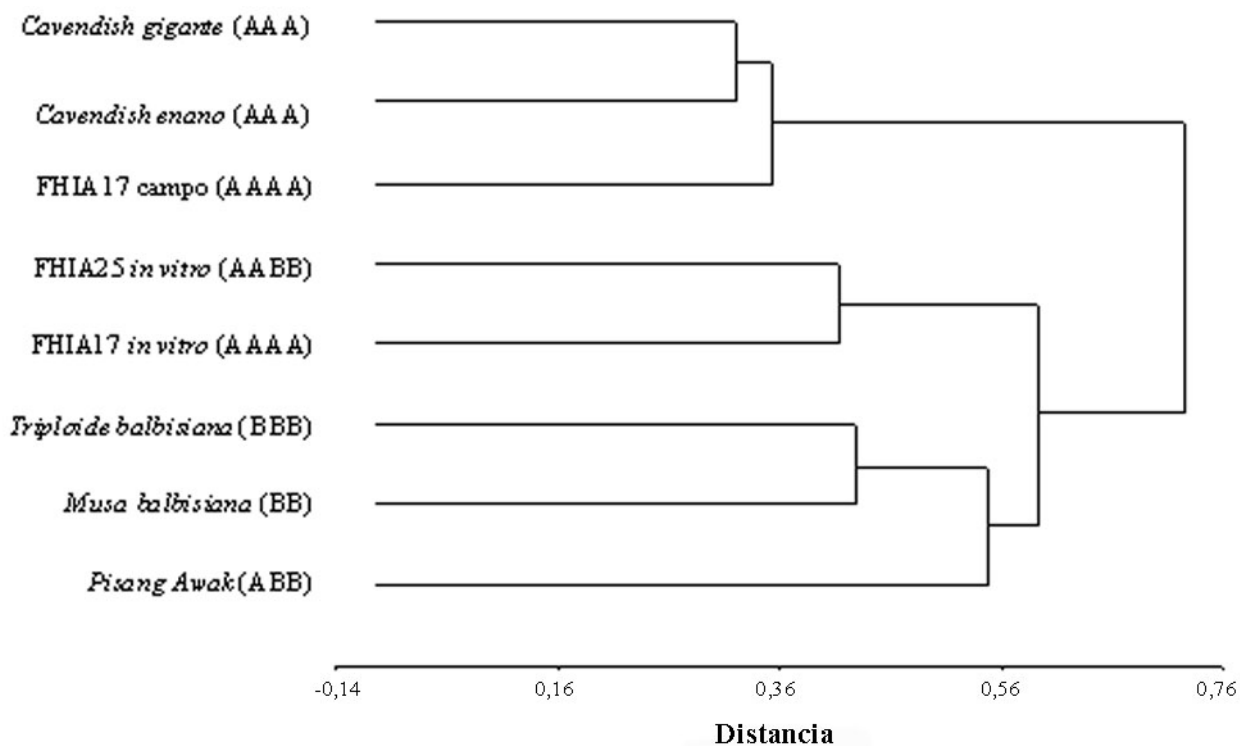


FIGURA 3. Dendrograma del análisis conglomerado jerárquico de ocho materiales de *Musa* caracterizados mediante patrones RAPD

Los dos materiales analizados del clon FHIA 17 tienen huellas genéticas completamente diferentes, estando ubicados en grupos distintos. Esta diferencia puede deberse a mutaciones producidas durante la reproducción *in vitro*, variación somaclonal. Sin embargo, dada la ubicación del material FHIA 17 en grupos donde hay presencia del genoma B, y la semejanza genética con el material FHIA 25, es factible que la muestra seleccionada *in vitro* esté mal etiquetada y no corresponda al genotipo señalado. En cualquier caso, hace falta realizar una exploración más detallada con materiales FHIA 17 procedentes de campo y de propagación *in vitro*, a fin de dilucidar el origen de la variabilidad genética encontrada.

CONCLUSIONES

- Los patrones de bandas RAPD permitieron generar una huella genética para cada genotipo estudiado y posibilitaron el establecimiento de polimorfismos entre los genotipos con respuesta diferencial al ataque de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. Los primers de la serie OPA determinaron un mayor grado de polimorfismos que los primers de las series OPJ y OPM estudiados.
 - Se identificaron seis bandas presentes en los genotipos con genoma B, los cuales se señalan como tolerantes a la bacteria, convirtiéndose en candidatas a ser utilizadas como herramientas moleculares para asistir la selección de genotipos tolerantes, una vez se compruebe la correlación entre las bandas y la tolerancia al patógeno.
 - Los genotipos estudiados se dividen en dos grandes grupos, uno de los cuales se formó con los individuos que portaban exclusivamente el genoma A. El segundo grupo, comprendió los genotipos que portaban el genoma B y un genotipo tetraploide para el genoma A producido *in vitro*. Este último presentó diferencias genéticas con un genotipo similar provenientes de condiciones de campo. Las diferencias pueden deberse a variación somaclonal o a errores en la identificación del material *in vitro*, por lo que se recomienda un trabajo más detallado, caracterizando los dos tipos de materiales.
- miento y biología molecular para el desarrollo de resistencia al añublo del arroz. Octubre 14-18, Cali, Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1999. Taller integración de fitopatología, mejora-

Damasco, O. P., G. C. Graham, R. J. Henry, S. W. Adkins, M. K. Smith and I. D. Godwin. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated cavendish (*Musa sp.* AAA) bananas. *Plant Cell Reports*. 16:118-123.

Dellaporta, S. J., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.

García, E. y C. Giménez. 1999. El uso de marcadores moleculares en la detección de variantes somaclonales en *Musa ssp.* *Mem. Inst. Biol. Exp.* 2:115-118.

Gubbuk, H., M. Pekmezci, A. N. Omus and M. Erkan. 2004. Identification and selection of superior banana phenotypes in the cultivar Dwarf Cavendish using characteristics and RAPD markers. *Pakist. J Bot.* 36:331-342.

Howell, E. C., J. H. Newbury, R. Swennen, L. A. Wilhers and B. V. Ford-Lloyd. 1994. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. *Genome* 37:328-332.

Javed, M. A. and R. Y. Othman. 2005. Characterization of Fusarium wilt-resistant and Fusarium wilt-susceptible somaclones of banana cultivar Rastali (*Musa AAB*) by Random Amplified Polymorphic DNA and Retrotransposon markers. *Plant Molec. Biol. Rep.* 23:241-249.

Javed, M. A., M. Chai and R. Y. Othman. 2004. Study of resistance to *Fusarium oxysporum* using RAPD markers. *Biol. Plant.* 48:93-99.

Kaemmer, D., R. Afza, K. Weising, G. Kahl and F. J. Novak. 1992. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa spp.*) *Biotechnology* 10:1 030-1 035.

Lakshmanan, V., S. R. Venkataramareddy and B. Neelwarne. 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shorts of banana using RAPD and ISSR markers. *E. J. Biotechnol.* 10(1). Disponible en: <http://www.ejbio technology.info/content/vol10issue1/full/12/>.

- Martin, K. P., S. K. Pachathundikandi, C. L. Zhang, A. Slater and J. Madassery. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 42:188-192.
- Nadal-Medina, R., G. Manzo-Sánchez, J. Orozco-Romero, M. Orozco-Santos y S. Guzmán-González. 2009. Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa* spp.) Determinada mediante marcadores RAPD. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32(1):1-7.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2004. FAOSTAT Agricultura. Superficie, producción y rendimiento. Disponible en <http://www.fao.org>.
- Pérez Vicente, L. 2009. Enfermedades exóticas que constituyen una amenaza para la estabilidad de la producción de bananos y plátanos en América Latina y el Caribe. *Fitosanidad* 13(1):34-35.
- Pillay, N., D. C. Nwakanma and A. Tenkouano. 2000. Identification of RAPD markers to A and B genome sequences in *Musa* L. *Genome* 43:763-767.
- Pillay, M., E. Ougundidiwin, D. C. Nwakanma, G. Ude and A. Tenkouano. 2001. Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germoplasm. *Theor Appl Genet.* 102:965-970.
- Ramaje, C. M., A. M. Borda, S. D. Hamill and M. K. Smith. 2004. A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas (*Musa* spp. AAA). *Sci. Hort.* 103:45-151.
- Ray, T., I. Dutta, P. Saha, S. Das and S. C. Roy. 2006. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85:11-21.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker and M. De Loose. 2000. AFLP Markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed* 6:125-134.
- Salazar, B., H. Laurentín, M. Dávila and M. Castillo. 2006. Reliability of the RAPD technique for germplasm analysis of sesame (*Sesamum indicum* L.) from Venezuela. *Interciencia* 31(6):456-460.
- Thu, N. X., L. T. L. Oanh y H. H. Nhi. 2002. Utilización de la técnica RAPD para la identificación y clasificación de algunos cultivares de banano en Vietnam. *INFOMUSA* 11(1):48-49.
- Tripathi, L., J. N. Tripathi y W. K. Tushemereirwe. 2004. Estrategias para la resistencia a la enfermedad de la marchitez bacteriana de los plátanos a través de la ingeniería genética. *African Journal of Biotechnology* 3(12):688-692.
- Tripathi, L. and J. N. Tripathi. 2009. Relative susceptibility of banana cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *African Journal of Biotechnology* 8(20):5.343-5.350.
- Uma, S., S. A. Siva, M. S. Saraswathi, M. Manickavasagam, P. Durai, R. Selvarajan and S. Sathiamoorthy. 2006. Variation and intraspecific relationships in India wild *Musabalbisiana* (BB) population as evidenced by Random Amplified Polymorphic DNA. *Gen. Resour. Crop Evol.* 53:349-355.
- Vidal, M. C. and E. García. 2000. Analysis of *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow sigatoca. *Plant Molec. Biol. Rep.* 18:23-31.
- Visser, A. H. 2001. Characterization of banana and plantain using random amplified polymorphic DNA markers. *Horticult. Abstr.* 72(2):1 154.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7 213-7 218.
- Williams, J., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski and S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Ac. Res.* 18:6 531-6 535.
- Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol* 218:704-740.
- Zambrano, A. Y., G. Martínez, Z. Gutiérrez, E. Manzanilla, J. L. Vicente-Villardón y J. Demey. 2007. Marcador RAPD asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* en *Musa*. *Interciencia* 32(11):775-779.