

# ORGANOGENESIS DIRECTA DE YEMAS FLORALES DE *Musa* sp., Y VARIACIÓN SOMACLONAL EVALUADA POR MARCADORES MOLECULARES

## DIRECT ORGANOGENESIS OF FLORAL BUDS AND SOMACLONAL VARIATION OF *Musa* sp. EVALUATED BY MOLECULAR MARKERS

López-Gómez, P.<sup>1</sup>; Youssef, M.<sup>2</sup>; Kú-Cauich, J.R.<sup>3</sup>; Enriquez-Valencia, J.A.<sup>3</sup>; Iracheta-Donjuan, L.<sup>1</sup>; Escobedo-GraciaMedrano R.M.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biotecnología. INIFAP. Km 18 Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas, México. <sup>2</sup>Universidad de Assiut, Egipto. <sup>3</sup>UBBM-CICY Calle 43, 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán.

\*Autor responsable: escobedo@cicy.mx

### RESUMEN

En este estudio se investigó la variación somaclonal de plantas regeneradas *in vitro* por organogénesis directa (OD) a partir de explantes de yemas florales en proliferación, de *Musa* sp., al utilizar marcadores tipo secuencias internas de regiones simples repetidas (ISSR), polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas (SRAP) y polimorfismo amplificado dirigido a intrones (ITAP). Las flores masculinas inmaduras de *M. a.xM. b.* (AAB, Silk) cv. Manzano sirvieron de explante inicial para la regeneración *in vitro* de plantas mediante OD. La formación de yemas florales en proliferación, en promedio fue de 5.9 yemas explante<sup>-1</sup>. Estas yemas se emplearon para inducir la diferenciación de brotes vía OD. Se formó 4.4 brotes por explante. El empleo de cebadores ISSR, combinaciones SRAP y combinaciones ITAP, reveló un polimorfismo entre plantas regeneradas por OD de 36.3, 19.5 y 13.7%, respectivamente. En este trabajo se discuten los factores evaluados para la regeneración *in vitro* vía OD y su influencia en la variación observada.

**Palabras clave:** marcadores moleculares, ISSR, SRAP, ITAP, *in vitro*.

### ABSTRACT

In this study the somaclonal variation of plants regenerated *in vitro* through direct organogenesis (DO), from floral bud explants of *Musa* sp. in proliferation, was researched, by using inter simple sequence repeats (ISSR), sequence repeats amplified polymorphism (SRAP), and intron directed amplified polymorphism (ITAP) markers. The immature masculine flowers of *M. a.xM. b.* (AAB, Silk) cv. Manzano served as initial explant for the *in vitro* regeneration of plants through DO. The formation of floral buds in proliferation was in average 5.9 buds explant<sup>-1</sup>. These buds were used to induce the differentiation of buds via DO. 4.4 buds were formed per explant. The use of ISSR starters, SRAP combinations and ITAP combinations revealed polymorphism between plants regenerated through DO of 36.3, 19.5 and 13.7%, respectively. In this study, the factors evaluated for the *in vitro* regeneration via DO and its influence in the variation observed are discussed.

**Keywords:** molecular markers, ISSR, SRAP, ITAP, *in vitro*.



## INTRODUCCIÓN

La propagación de variedades comestibles de banano (*Musa* sp.) se lleva a cabo principalmente de manera vegetativa, usando hijuelos provenientes de campo. Como alternativa se ha utilizado el cultivo de tejidos vegetales vía organogénesis directa, debido a que ha mostrado mayor estabilidad genética. Aunque, reportes recientes sostienen lo contrario, ya que parece depender del genotipo, del tiempo en el cultivo *in vitro* y los reguladores de crecimiento (RC) utilizados (Mohamed 2007; Bairu *et al.*, 2006). Pérez-Hernández y Rosell-García 2008, describieron una metodología en *Musa acuminata* Colla, AAA, subgrupo Cavendish, cv. Dwarf Cavendish, que considera el uso de flores masculinas jóvenes, a partir de las cuales se induce la formación de nuevas yemas florales y su proliferación *in vitro*. Estos explantes han mostrado potencial organogénico (Darvari *et al.*, 2010), sin embargo, es necesario evaluar dicha metodología en cultivares de interés. La variación somaclonal, es un factor común en varios protocolos de micropropagación de banano (Bairu *et al.*, 2006). Se han reportado variantes somaclonales en éste, con características deseables, tales como el CIEN BTA-03 (AAAA), cuyos frutos son más grandes y presenta resistencia a Sigatoka amarilla respecto a su parental *M. a.* (AAA) cv. Williams (Emaldi *et al.*, 2004; Giménez *et al.*, 2001); y a este respecto, el uso de marcadores moleculares representa uno de los métodos adecuados para la detección temprana de variantes somaclonales (Aremu *et al.*, 2013). En banano se han evaluado los ISSR (regiones internas de secuencias simples repetidas), los cuales son utilizados por su alta naturaleza discriminativa (Chandrika *et al.*, 2010). Otras técnicas como el polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas (SRAP), el cual se basa en los marcos de lectura abiertos (ORFs), tiene como ventajas el ser multilocus y de características multialelicas, altamente rentable y no es específico para una especie (Li y Quiros, 2001). En tanto que, los marcadores ITAP amplifican regiones de intrones y regiones de secuencias de empalme intrón-exón. El polimorfismo revelado por esta técnica puede atribuirse a la variabilidad en la longitud de los intrones y a mutaciones puntuales por los sitios de unión de los cebadores ITAP (Xiong *et al.*, 2013). El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta organogénica de yemas florales en proliferación y el estudio de la variación somaclonal con marcadores ISSR, SRAP e ITAP en regenerantes *in vitro* en el cv. Manzano (AAB) de *Musa* sp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Regeneración *in vitro* vía organogénesis directa (OD)

Se utilizaron inflorescencias masculinas de *M. acuminata* × *M. balbisiana*, AAB, cv. Manzano de la colección de musáceas del CICY, ubicada en el Sitio Experimental Uxmal del INIFAP (INIFAP-Uxmal). Las inflorescencias se lavaron y desinfectaron de acuerdo a lo descrito por Youssef *et al.* (2010). La mano floral masculina por cada posición se sembró en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 2.5  $\mu\text{M}$  tiazurón (TDZ), 1  $\mu\text{M}$  ácido 3-indolacético, 87 mM de sacarosa, pH ajustado a 5.7 y 2 g L<sup>-1</sup> de Gelrite®; 25 mL del medio en un frasco con capacidad de 100 mL. Los frascos con los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 min. Se sembraron cuatro piezas por frasco, tres frascos en total. La incubación fue en oscuridad a 24±2 °C. Se realizaron subcultivos al mismo medio cada dos

semanas, hasta la aparición de nuevas yemas florales. Posteriormente se realizaron subcultivos cada mes. En esta etapa se evaluó el número de yemas florales por explante a los 30, 45 y 75 días de establecimiento. Se evaluaron tres concentraciones de TDZ (1, 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ ) en el medio de inducción. Se emplearon yemas florales en proliferación. Se tuvieron cinco réplicas por tratamiento, y cada réplica fue un frasco con cinco piezas de yemas florales. La variable que se evaluó fue el número de yemas florales a 60 días después de la siembra en condiciones de oscuridad a 24±2 °C. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar y se aplicó análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05%, con el programa SAS System 2004 versión 9.0.

### Proliferación, crecimiento, enraizamiento y aclimatación de brotes

Los brotes obtenidos de la fase anterior, se transfirieron a un medio de crecimiento (sales minerales y vitaminas de MS, adicionado con 1  $\mu\text{M}$  AIA, 1  $\mu\text{M}$  6-bencilaminopurina (BAP), 87 mM sacarosa y 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Los brotes se inocularon en frascos de 100 mL de capacidad con 25 mL del medio. Con la finalidad de conocer la capacidad proliferativa de los brotes en este medio, se evaluó el número de brotes por explante a los 60 d después de la siembra.

Los brotes obtenidos de la fase de crecimiento se transfirieron a un medio de enraizamiento (MS con 87 mM sacarosa y 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Se utilizaron recipientes Magenta® de 375 mL de capacidad con 50 mL del medio. Los materiales sem-

brados se cubrieron con plástico celofán de 15×25 cm. El medio de crecimiento y de enraizamiento se ajustaron a un pH de 5.8 y gelificado con 2 g L<sup>-1</sup> de Gelrite®. La etapa de crecimiento y enraizamiento fueron en oscuridad por cuatro días y posteriormente se transfirieron a condiciones de fotoperiodo (16h:8h, luz: oscuridad) por 30 d. las plántulas con buen desarrollo después de la fase de enraizamiento, se lavaron y para prevenir contaminación el área radical se desinfectó con bactericida-fungicida [2 g L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina y 1 mL L<sup>-1</sup> de propiconazol (Tilt 250CE®)]. Las plántulas se transfirieron a sustratos a base de suelo orgánico y turba de esfagna relación 3:1 (v/v) en bolsas de vivero (13×14 cm), a las que se les colocaron en la parte superior un domo de plástico celofán. Estos domos se retiraron de manera gradual, en condiciones de invernadero.

#### **Análisis con marcadores moleculares para determinar variación somaclonal**

Se utilizaron 100 mg de hojas cigarro de 25 plantas regeneradas. El ADN genómico total se extrajo de acuerdo a lo descrito por Youssef *et al.* (2015). La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría. Con las 25 plantas se hicieron grupos, conformados por cinco plantas regeneradas, por lo que se tuvieron cinco grupos. El ADN genómico de cada grupo, se amplificó por PCR con cebadores ISSR, SRAP e ITAP.

#### **Condiciones de PCR para cebadores ISSR**

En un volumen final de 20  $\mu$ l contuvo 1 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> del templado de ADN genómico, 1X amortiguador de PCR, 0.25 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 pmol de cebador ISSR,

0.06 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> Taq DNA-polimerasa y 12.25  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La reacción de amplificación consistió en desnaturalización a 94 °C durante 5 min (1 ciclo), expansión con 35 ciclos de 30 s, desnaturalización a 94 °C, alineamiento a temperatura variable de acuerdo al cebador por 30 s y extensión a 72 °C durante 2 min, seguido de una extensión final por 5 min a 72 °C, en un termociclador de gradiente (Eppendorf).

#### **Condiciones de PCR para la selección de cebadores SRAP e ITAP**

En un volumen final de 20  $\mu$ l contuvo 1.25 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> del templado de ADN genómico, 1X amortiguador de PCR, 0.25 mM dNTP's, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 pmol de cebador sentido y antisentido (Me y Em para SRAP; Em e ltrpr para ITAP), 0.06 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> Taq DNA-polimerasa y 12.25  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La reacción de amplificación consistió en desnaturalización a 94 °C durante 2 min (1 ciclo), pre-amplificación con 5 ciclos de 94 °C por 30 s, 35 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min; seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 50 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min, seguido de una extensión final durante 5 min a 72 °C, en un termociclador de gradiente (Eppendorf).

#### **Electroforesis del ADN producto de la amplificación**

Se mezclaron 2  $\mu$ L del producto de PCR con 3  $\mu$ L de colorante de carga [2X DNA 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03% (p/v) azul de bromofenol, 0.03% (p/v) xilen cianol FF, 60% de glicerol (v/v), 60 mM EDTA]. Se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.8%. Se cargó un carril del gel con el marcador de 100 a 3000 pb (Thermo Scientific GenRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use). El gel fue corrido con amortiguador TBE 1X a 7V cm<sup>-1</sup> durante 2.5 h. Los geles se analizaron bajo luz UV y se fotografiaron con un equipo DNR Bio-Imaging Systems (MiniBIS Pro).

#### **Análisis de datos**

Las bandas ISSR, SRAP e ITAP de igual tamaño y movilidad generadas por el mismo cebador fueron tratadas como idénticas para ese locus. Se construyó una matriz binaria con la ausencia (0) y presencia (1) de bandas. Con el programa NTSYS-PC (versión 2.21q), se calculó la similitud genética con el coeficiente de Jaccard. Los valores de similitud de Jaccard se utilizaron para generar un dendrograma mediante el procedimiento UPGMA (Unweighted Pair-Group with Arithmetic Mean). Este último se sustentó con un bootstrapping de 1000 repeticiones con el programa FreeTree. Con el análisis de componentes principales se generó un gráfico de dispersión en 3D con NTSYS-PC. Se calcularon el contenido de información polimórfica

$$[PIC=2f_i(1-f_i)]$$

donde  $f_i$ =frecuencia con la que están presentes los fragmentos del marcador] y el poder de resolución

$$[RP=\sum I/b]$$

donde  $I/b=1-[2|0.5-p|]$  y  $p$ =proporción de accesiones que contienen una banda  $I$ ] (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000; Prevos y Wilkinson 1999).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Regeneración *in vitro* vía organogénesis directa (OD)

En la inducción de yemas florales *in vitro*, se obtuvieron 3.9, 5.5 y 5.9 brotes por explante a los 30, 45 y 75 d, respectivamente (Figura 1a), similares al reportado por Darvari *et al.*, (2010), quienes obtuvieron 6 y 6.5 yemas por explante en *M. a.* × *M. b.* (AAB) cvs. Nangka y Rastali respectivamente. Esta similitud en respuesta puede atribuirse a que estos cultivares comparten el mismo constituyente genómico.

### Concentración de TDZ para el mantenimiento de la proliferación de yemas florales

Cuando se evaluó la concentración de TDZ adecuada para el mantenimiento de las yemas florales en proliferación, no se encontraron diferencias significativas por efecto de la concentración de TDZ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), sin embargo, la concentración adecuada fue  $5 \mu\text{M}$  TDZ con 11.2 yemas por explante en promedio. Darvari *et al.* (2010), sugieren el uso de  $2.7 \mu\text{M}$  TDZ, pues obtuvieron 6 y 6.5 en los cvs. Rastali y Nangka de constitución genómica idéntica al cv. Manzano (AAB).

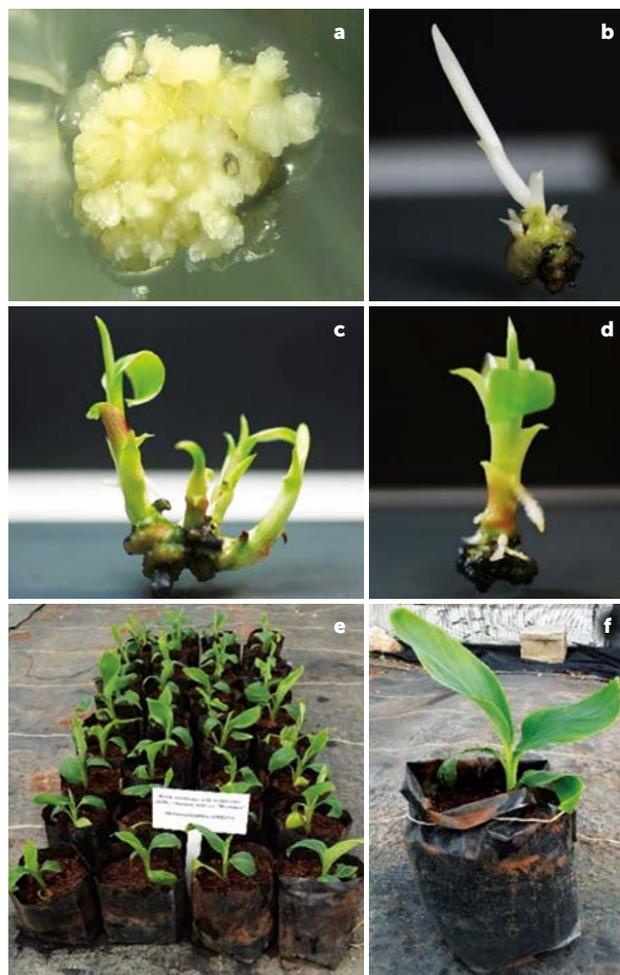
### Proliferación de brotes

Al emplear las yemas florales en proliferación para la inducción de brotes, se formaron 4.4 brotes por explante (Figura 1b y c) en el medio MS, con  $1 \mu\text{M}$  de AIA,  $1 \mu\text{M}$  BAP, 87 mM de sacarosa y 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Este mismo medio

ha sido empleado de manera general para la proliferación de brotes al hacer uso de yemas laterales de meristemos de rizoma. Cuando se usó un medio a base de MS suplementado con  $9.3 \mu\text{M}$  kinetina y  $2.7 \mu\text{M}$  ANA en *M. a.* (AAA) cv. Vaibalha se obtuvieron 3.5 brotes por explante (Hrahsel *et al.*, 2014). Mientras que Darvari *et al.* (2010), al evaluar diversos cultivares sugieren el uso de diferentes tipos y concentraciones de citocininas en el medio de proliferación, en función de la composición genómica del cultivar. La consecución hasta la regeneración de plantas por OD se puede visualizar en las Figuras 1 e y f.

### Análisis molecular con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP de regenerantes *in vitro* por OD del cv. Manzano

Con ISSR, se amplificaron de 9 a 12 bandas, con un total de 55, de los cuales de 2 a 5 fueron polimórficas, con un total de 20. El porcentaje de polimorfismo varió desde 22.2% con el cebador UBC-848 hasta 45% con los cebadores UBC-817 y UBC-841. El polimorfismo total de plantas regeneradas por OD con ISSR fue de 36.4%. El valor de PIC varió de 0.08 a 0.32 y el RP de 1.2 a 5.1. Con los datos generados con ISSR y al aplicar el procedimiento UPGMA, se observó similitud entre plantas regeneradas por OD que fue desde 0.67 a 0.97. Con las combinaciones SRAP se amplificaron un total 41 bandas, que fue de 13 a 15, de los cuales ocho fueron polimórficas. El polimorfismo varió de 7.7% a 33.3%, generados por las combinaciones Me4/Em7 y Me1/Em7, respectivamente, con un total de 19.5%. Los valores de PIC y RP para estos cebadores variaron de 0.02 a 0.12 y 0.4 a 2.8 respectivamente. La similitud con SRAP fue de 0.86 a 0.95. La combinación de cebadores ITAP detectó polimorfismo que varió de 0 a 62.5% con la combinación Em3/ltpr2 y Em8/ltpr1, respectivamente, con un total de 13.7%. Producto de la amplificación de 102 bandas, de los cuales 14 fueron polimórficas. Los valores de PIC variaron de 0 a 0.12 y los de RP fueron de 0 a 3.2. La similitud entre plantas regeneradas por OD con ITAP varió de 0.87



**Figura 1.** Regeneración *in vitro* de plantas por OD; a) yemas florales en proliferación; b y c) inducción de brotes múltiples; d) brote desarrollado; e) plántulas en fase de aclimatación y f) planta de tres meses de edad empleado para análisis molecular.

a 0.99. El polimorfismo total entre plantas regeneradas por OD al combinar los tres marcadores evaluados fue de 21.2% (Cuadro 1). La similitud al usar el coeficiente de Jaccard de los tres tipos de marcadores fue de 0.83 a 0.92 entre plantas regeneradas por OD (Figura 2a). La gráfica de dispersión basado en el análisis de coordenadas principales muestra la relación que hay entre los grupos de plantas regeneradas por OD. El grupo de plantas de OD1 se muestra como punto de referencia para la relación que hay con el resto de los grupos (Figura 2b). Al contrastar el polimorfismo observado por los tres sistemas de marcadores entre plantas regeneradas por OD, se obtuvieron cifras de 36.4, 19.5 y 13.7% con ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente. Estos datos son mayores a los observados en el cv. Nanjanagudu Rasabale (AAB), ya que al regenerar plantas por OD, pero con el uso de ápices de brotes de hijuelos de espada, se observaron patrones homogéneos con el uso de 12 y 50 cebadores ISSR y RAPD, respectivamente (Lakshmanan *et al.*, 2007). Por su parte, Ray *et al.* (2006) encontraron alta estabilidad genética en el cv. Martaman (AAB) en plantas micropropagadas por OD con el empleo de 12 cebadores ISSR. En contraste, estos mismos autores reportaron mayor detección de polimorfismo con los cebadores ISSR comparados con los cebadores de RAPD. El polimorfismo encontrado en este trabajo está dentro de la media del rango de 23.7% a 55.9% de polimorfismo con el uso de 10 cebadores ISSR reportado por Aremu *et al.* (2013) para el cv. Williams (AAA) con el uso de diferentes citocininas. A este respecto se sugiere que tanto el tipo de citocininas como el ciclo de subcultivos contribuyen al grado de variación encontrada. En general hay pocas referencias en cuanto al nivel de polimorfismo entre plantas regeneradas por OD al utilizar explantes florales (0%

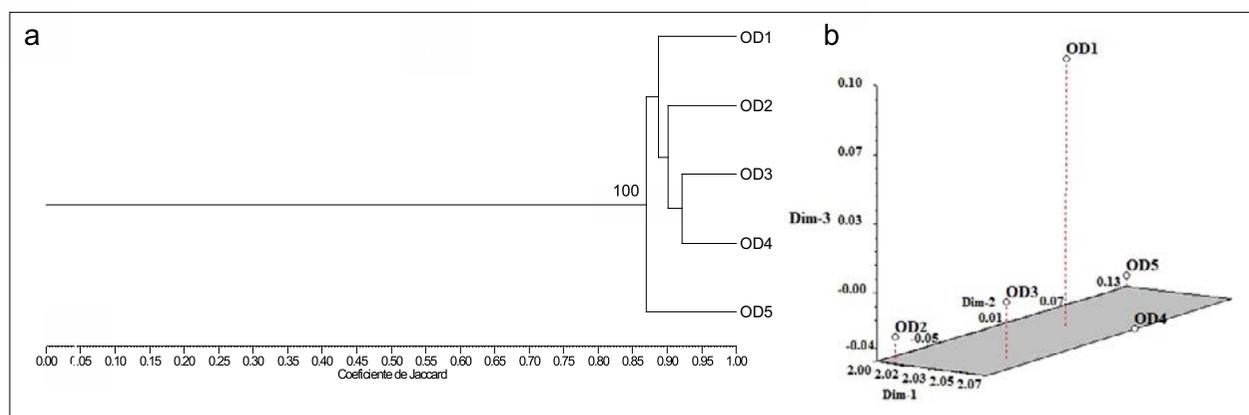
de polimorfismo con RAPD e ISSR) (Hrahsel *et al.* 2014). Por lo que, este es uno de los pocos trabajos en el que se estudia la variación somaclonal de plantas regeneradas por OD a partir de yemas florales del cv. Manzano.

El nivel de polimorfismo revelado en plantas regeneradas por OD se puede atribuir a diversos factores; uno de ellos pudo haber sido el uso del 2.5  $\mu\text{M}$  de TDZ durante la inducción y proliferación de yemas florales, pues en *M. a.xM. b.* (AAB) cv. CEMSA 3/4, al utilizar un rango de 1.3 a 22.2  $\mu\text{M}$  TDZ, se observaron brotes morfológicamente anormales. Manjula *et al.* (2014) observaron anomalías morfológicas y variación de 11% a 20% en el cv. Rajapari (AAB) al emplear 1  $\mu\text{M}$  TDZ. Así mismo el uso de 8.9  $\mu\text{M}$  BA con 1  $\mu\text{M}$  AIA para la obtención de brotes múltiples pudo influenciar el polimorfismo. Se han descrito diferentes efectos de las citocininas en la inducción de VS en *Musa*. Por ejemplo, Giménez *et al.* (2001) reportaron la obtención del soma clon CIEN-BTA-03 al utilizar 66.6  $\mu\text{M}$  BA y Martin *et al.* (2006) del soma clon CUDBT-B1 con el uso de 13.3  $\mu\text{M}$  de BA. Bairu *et al.* (2006) reportaron 55% de polimorfismo con marcadores RAPD al utilizar de 11.1 a 22.2  $\mu\text{M}$  BA en el cv. Zelig (AAA).

Finalmente, será necesario evaluar el comportamiento de las plantas regeneradas a nivel de campo para ver si la variación observada se correlaciona con alguna variación fenotípica para alguna característica de utilidad, tal como resistencia a factores bióticos o abióticos o bien mayor rendimiento y calidad del fruto.

## CONCLUSIONES

Se logró la regeneración de plantas por organogénesis a partir de



**Figura 2.** a: dendrograma de similitud genética obtenido del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, con el coeficiente de Jaccard de regenerantes *in vitro* por OD mediante marcadores ISSR-SRAP-ITAP. b: gráfico de dispersión que muestra la relación entre plantas regeneradas por OD basado en el análisis de coordenadas principales con marcadores ISSR-SRAP-ITAP.

**Cuadro 1.** Características, porcentaje de polimorfismo (P), contenido de información polimórfica (PIC), poder de resolución (RP) de cebadores ISSR, combinaciones SRAP e ITAP del análisis molecular de regenerantes por OD del cv. Manzano.

Cebador ISSR	Secuencia	TA °C <sup>†</sup>	P (%)	PIC	RP	Rango (pb)
UBC-817	5'-GACACGACAC-3'	54.9	45	0.21	4	200-2750
UBC-848	5'-GACAGACAGACARG-3'	47	22.2	0.08	1.2	260-2875
Mat-32	5'-CACACACACACACACAA-3'	47.2	25	0.09	1.6	200-3000
UBC-841	5'-CACACACACACACACARG-3'	52	45	0.2	3.6	200-1400
Mat-15	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3'	50.4	41	0.32	5.1	300-2000
Total ISSR			36.4	0.08-0.32	1.2-5.1	200-3000
Combinación SRAP	Secuencia sentido	Secuencia antisentido				
Me1/Em7	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'	33.3	0.13	2.8	90-2000
Me3/Em6	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'	15.3	0.06	1.2	140-1800
Me4/Em7	5'-TGAGTCCAAACCGGACC -3'	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'	7.7	0.02	0.4	110-1950
Total SRAP			19.5	0.02-0.13	0.4-2.8	90-2000
Combinación ITAP	Secuencia sentido	Secuencia antisentido				
Em3/Itpr2	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'	5'-GACTGCGTACCTGCATGC-3'	0	0	0	140-1500
Em3/Itpr5	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'	5'-GACTGCGTACCTGCAGCT-3'	6.3	0.03	0.8	130-2000
Em6/Itpr3	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'	5'-GACTGCGTACCTGCAGAC-3'	5.6	0.02	0.4	130-1440
Em7/Itpr4	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'	5'-GACTGCGTACCTGCAATG-3'	5.6	0.03	0.8	140-1700
Em7/Itpr5	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'	5'-GACTGCGTACCTGCAGCT-3'	29.4	0.12	3.2	110-1900
Em8/Itpr1	5'-GACTGCGTACGAATTAGC-3'	5'-GACTGCGTACCTGCAAAT-3'	62.5	0.2	2.3	110-1650
Em10/Itpr5	5'-GACTGCGTACGAATTITAG-3'	5'-GACTGCGTACCTGCAGCT-3'	7.7	0.02	0.4	100-1500
Total ITAP			13.7	0-0.12	0-3.2	100-2000
Total ISSR-SRAP-ITAP			21.2	0-0.32	0-5.1	90-3000

UBC=University of British Columbia. <sup>†</sup>Temperaturas de alineamiento producto de experimentos de PCR en gradiente por cebador.

yemas florales en proliferación en el cv. Manzano de *Musa*. El nivel de variación observado con el uso de marcadores ISSR, SRAP e ITAP dependió del tipo de marcador. Se encontró que con el uso de cebadores ISSR se detecta mayor variación seguido por las combinaciones SRAP y el nivel más bajo con la combinación de cebadores ITAP. Lo anterior revela lo conveniente de usar distintos tipos de marcadores ya que analizan diferentes regiones del ADN genómico.

### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico mediante la beca de maestría No. 369555.

### LITERATURA CITADA

Aremu A.O., Bairu M.W., Szucová L., Dolezal K., Finnie J.F., Van Staden J. 2013. Genetic fidelity in tissue-cultured Williams bananas-The effect of high concentration of topolins and benzyladenine. *Scientia Horticulturae* 161: 324-327.

Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147-173.

Bairu M.W., Fennell C.W., Van Staden J. 2006. The effect of plant growth

regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. Zelig). *Scientia Horticulturae* 108: 347-351.

Chandrika M., Ravishankar Rai V., Thoyajaksha. 2010. ISSR marker based analysis of micropropagated plantlets of *Nothapodytes foetida*. *Biologia Plantarum* 54: 561-565.

Darvari F.M., Sariah M., Puad M.P., Maziah M. 2010. Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa* sp.) cultivars using male flowers. *African Journal of Biotechnology* 9: 2360-2366.

Emaldi U., Trujillo I., De García E. 2004. Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruits* 59: 257-263.

Giménez C., De García E., De Enrech N.X., Blanca I. 2001. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant Cien BTA-03. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37: 217-222.

Hrahse L., Basu A., Sahoo L., Thangjam R. 2014. *In vitro* propagation and assessment of the genetic fidelity of *Musa acuminata* (AAA) cv. Vaibalhla derived from immature male flowers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 1530-1539.

Lakshmanan V., Venkataramareddy S.R., Neelwarne B. 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 106-113.

Manjula R., Jholgiker P., Subbaiah K.V., Prabhuling G., Swamy G.S.K., Lenin K.Y. 2014. Morphological abnormality among hardened shoots of banana cv. Rajapuri (AAB) after *in vitro* multiplication

- with TDZ and BAP from excised shoot tips. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* 7: 465-470.
- Martin K.P., Pachathundikandi S.K., Zhang C.L., Slater A., Madassery J. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 188-192.
- Mohamed A.E. 2007. Morphological and molecular characterization of some banana micro-propagated variants. *International Journal of Agriculture & Biology* 9: 707-714.
- Murashige, T., F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Pérez-Hernández J.B., Rosell-García P. 2008. Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. Dwarf Cavendish) male flowers. *Plant Cell Reports* 27: 965-971.
- Prevost A., Wilkinson M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107-112.
- Ray T., Dutta I., Saha P., Das S., Roy S.C. 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, Tissue and Organ Culture* 85: 11-21.
- Roldán-Ruiz I., Dendauw J., Van-Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding* 6: 125-134.
- Xiong F., Liu J., Zhong R., Jiang J., Han Z., He L., Li Z., Tang X., Tang R. 2013. Intron targeted amplified polymorphism (ITAP), a new sequence related amplified polymorphism-based technique for generating molecular markers in higher plant species. *Plant Omics* 6: 128-134.
- Youssef M., James A., Mayo-Mosqueda A., Ku Cauich J.R., Grijalva-Arango R., Escobedo-GM R.M. 2010. Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology* 9: 2216-2223.
- Youssef M., Valdez-Ojeda R., Ku-Cahuich J.R., Escobedo-GraciaMedrano R.M. 2015. Enhanced protocol for isolation of plant genomic DNA. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*. 4:172-180.

