

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE VARIANTES SOMACLONALES¹

Neiva Sánchez-Chiang², Víctor M. Jiménez²

RESUMEN

Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. La variación somaclonal es la variación genética o epigenética que se genera durante el cultivo *in vitro* de plantas (cultivos celulares de tejidos u órganos) que provenga de células somáticas. En programas de mejoramiento genético, la variación somaclonal puede constituirse en un recurso importante que genera variabilidad. Sin embargo, durante la micropropagación y en bancos de germoplasma *in vitro*, este tipo de variación es indeseable. En vista de lo anterior, se han utilizado una serie de técnicas moleculares para su detección. En esta revisión bibliográfica se presenta una descripción de las técnicas moleculares útiles en la detección de variación somaclonal *in vitro* y, además, una recopilación de trabajos publicados sobre la detección de variación somaclonal por medio de técnicas moleculares.

Palabras clave: Cambios epigenéticos, cultivo de tejidos, marcadores moleculares, mutaciones, variabilidad.

ABSTRACT

Molecular techniques for the detection of somaclonal variation. Soma-clonal variation comprises genetic or epigenetic changes that arise during the *in vitro* culture phase of somatic cells (cell, tissue, organ cultures, etc.). In plant breeding programs, soma-clonal variation might become an important source of variability. However, this kind of variation is undesirable for micro-propagation purposes and for germplasm conservation *in vitro*, where genetic fidelity is desired. Therefore, a series of molecular techniques has been used for detection of soma-clonal variation. This review presents a description of the main molecular techniques used to detect *in vitro* soma-clonal variation. Moreover, a compilation of scientific papers related to the detection of soma-clonal variation by molecular techniques is presented.

Key words: Epigenetic variation, tissue culture, molecular markers, mutations, variability.



INTRODUCCIÓN

La variación somaclonal se refiere a la variación que ocurre *in vitro* en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como en plantas regeneradas de los

mismos. La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Larkin y Scowcroft 1981, Navarro y Perea 1996, Pierik 1997, Brar y Brar 1998, Kaeppler *et al.* 2000, Sahijram *et al.* 2003, Anu *et al.* 2004, Mujib 2004).

¹ Recibido: 24 de marzo, 2008. Aceptado: 20 de marzo, 2009.

² Centro de Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS). Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica. neivas@agro.ucr.ac.cr; victor.jimenez@ucr.ac.cr

Cuando la variación somaclonal es heredable se le asocia con rearrreglos cromosomales, deleciones y mutaciones (Sánchez-Teyer *et al.* 2003, Noro *et al.* 2007). Por otro lado, cuando la variación somaclonal es epigenética, puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable (Pierik 1997, Kaeppler *et al.* 2000, Jain 2001, Smulders 2005), que puede estar asociado a alteraciones en los patrones de metilación del ADN (Kubis *et al.* 2003). Es importante aclarar que durante el cultivo *in vitro*, plantas como fresa, cítricos, papa y manzana sufren de cambios hormonales y morfológicos temporales (como aparición o desaparición de espinas y ramificaciones, morfología de la hoja, etc.). Esto se debe al proceso de rejuvenecimiento, promovido en muchos casos por reguladores de crecimiento, y no a causa de variación somaclonal (Mujib 2004).

La variación somaclonal puede ser utilizada como herramienta para inducir variabilidad genética y, en el mejor de los casos, obtener características agronómicas deseables (Araújo *et al.* 2001, Cassells y Curry 2001). Esta técnica ha sido aplicada para generar variabilidad, especialmente en plantas con propagación vegetativa, como el ajo (Al-Zahim *et al.* 1999). Nuevos cultivares con alto valor comercial han sido obtenidos también por medio de este fenómeno en arroz (*Oryza sativa*) (Araújo *et al.* 2001), chile dulce (*Capsicum annuum*) (Anu *et al.* 2004), palma aceitera (*Elaeis guineensis*) (Tregear *et al.* 2002), crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) (Martín *et al.* 2002), *Hypericum perforatum* (planta con propiedades farmacológicas) (Halušková y Košuth 2003). En los casos mencionados anteriormente, las características agronómicas generadas por la variación somaclonal fueron heredables. Otras variantes somaclonales han sido utilizadas comercialmente por sus características de resistencia a enfermedades, mejora en la apariencia de la planta, flores y frutos, tamaño, sabor, fragancia y presencia de metabolitos de interés. Tal es el ejemplo de variantes somaclonales de fresa (*Fragaria x ananassa*), resistentes a antracnosis (Hammerschlag *et al.* 2006).

Por otro lado, la variación somaclonal es indeseable en casos donde se desea mantener la uniformidad y características con valor agronómico (Ahloowalia 1998, Brar y Brar 1998, Sahijram *et al.* 2003). En estos casos es deseable reducir o, al menos, estimar la tasa de variación somaclonal (Gupta y Varshney 1999). El banano (*Musa* spp.) es un ejemplo donde la variación somaclonal puede ser no deseable, ya que

ocurre frecuentemente durante la propagación clonal en la cual interesa mantener la estabilidad del material (Sahijram *et al.* 2003).

La variación somaclonal puede detectarse por cambios fenotípicos visibles (en el vigor, producción, calidad, pigmentación o resistencia a enfermedades) o por medio de marcadores bioquímicos y moleculares. La detección es posible al comparar las diferencias entre el fenotipo parental y el fenotipo donde ha ocurrido el cambio (Brar y Brar 1998, Sahijram *et al.* 2003). Durante los últimos 20 años se han desarrollado diferentes técnicas moleculares que han sido utilizadas en estudios de evolución genética, poblaciones, ecología, mapeo genético, clonación de genes (Cruzan 1998, Picca *et al.* 2004). Muchas de estas técnicas moleculares han sido también una herramienta útil para detectar variación somaclonal de una manera más precisa y a nivel de ADN (Gupta y Varshney 1999, Cassells y Curry 2001, Polanco y Ruiz 2002, Martín *et al.* 2002, Mujib 2004), así como para determinar niveles y los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal (Aravanopoulos 2003).

En esta revisión bibliográfica se describen las diferentes técnicas moleculares empleadas para la detección de variación somaclonal. Además, se hace un listado exhaustivo de aquellos trabajos publicados en donde estas técnicas han sido utilizadas para evidenciar ese fenómeno.

FACTORES QUE PODRÍAN INDUCIR VARIACIÓN SOMACLONAL

Además de la tasa normal de variación, propia de las células vegetales en condiciones normales, formando parte de un tejido, en un órgano y planta intactos, hay factores externos, propios del cultivo *in vitro*, que pueden inducir acumulación de variaciones genéticas y epigenéticas, que se manifiestan en el fenotipo. Algunos factores externos son: (1) método de cultivo *in vitro* y patrón de desarrollo, (2) edad del cultivo y subcultivos, y (3) algunos componentes del medio de cultivo.

El método de cultivo in vitro y el patrón de desarrollo

La variación somaclonal se puede generar en todos los métodos comúnmente empleados para el

cultivo *in vitro* de plantas (cultivo de yemas, organogénesis y embriogénesis somática) (George 1993). Sin embargo, el patrón de desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* es un elemento clave que se relaciona con la variación somaclonal. Por ejemplo, cuando un tejido altamente diferenciado pasa por una etapa de desdiferenciación con una alta tasa de división celular, se puede generar mayor variación somaclonal que cuando ocurre un desarrollo directo hacia regeneración a partir de yemas apicales, axilares y embriones (Sahijram *et al.* 2003, Cardone *et al.* 2004).

Edad del cultivo y subcultivos

La proporción de variantes somaclonales aumenta en cultivos envejecidos y en plantas con varios subcultivos (Cardone *et al.* 2004). Lo anterior probablemente se debe a la acumulación de alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y mutaciones (Pierik 1997, Sahijram *et al.* 2003, Cardone *et al.* 2004). En ese sentido, Sahijram *et al.* (2003) mencionan que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho subcultivos, en el caso de diferentes variedades de banano.

El medio de cultivo y sus componentes

La composición del medio de cultivo es otro de los factores que puede inducir variación somaclonal. Se ha encontrado que los reguladores de crecimiento, principalmente aquellos con naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN, causando así cambios epigenéticos (George 1993, Brar y Brar 1998, Rakoczy-Trojanowska 2002, Sahijram *et al.* 2003). El estado físico del medio de cultivo (líquido o sólido) también puede influir en la aparición de variantes somaclonales, ya que un mismo tejido se comporta de diferente manera frente a los factores físicos asociados (oxigenación, tensión superficial y daños mecánicos). Por ejemplo, una deficiencia en la oxigenación del callo causa la producción de etanol que puede actuar como mutagénico (Cardone *et al.* 2004). En otro ejemplo, se encontró que explantes de piña (*Ananas comosus* cv. Amarelinho) cultivados en un sistema de inmersión temporal (medio líquido) presentaron tasas mayores de variación somaclonal que en cultivos semisólidos (Feuser *et al.* 2003).

TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL

La variación somaclonal puede ser caracterizada por diversos tipos de marcadores: (a) morfológicos, tales como estudio del cariotipo (análisis citológico), tamaño, color de las flores, forma de la hoja, etc. (Ahloowalia y Sherington 1985, Osuji *et al.* 1997, Tremblay *et al.* 1999, Mehta y Angra 2000); (b) patrones isoenzimáticos, que se basan en la presencia de isoformas de enzimas específicas, que tienen la misma actividad, pero con diferente estructura molecular (Jarret y Litz 1986, Chen *et al.* 1998, Müller-Starck 1998, Seo *et al.* 2004); (c) los basados en proteínas de reserva de las semillas (Maddock *et al.* 1985, Campa *et al.* 2004, Martín-Cuevas *et al.* 2004); y (d) aquellos basados en el ADN, los cuales constituyen el tema específico de esta revisión (Picca *et al.* 2004).

DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN ADN

Los marcadores moleculares basados en ADN se definen como segmentos particulares de ADN que evidencian polimorfismos que puede localizarse en una región codificante o no codificante, y revelar la ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos (Palombi y Damiano 2002, Picca *et al.* 2004, Azofeifa-Delgado 2006) y que idealmente son representativos a nivel del genoma completo (Agarwal *et al.* 2008). Para su aplicación, el ADN extraído es digerido por enzimas específicas (Jaligot *et al.* 2000), o bien, se amplifican utilizando imprimadores definidos, o combinando ambos procedimientos (Sahijram *et al.* 2003, Prado *et al.* 2007). Los resultados son visualizados como patrones de bandas en un gel (Al-Zahim *et al.* 1999, Jaligot *et al.* 2000). Como se mencionó anteriormente, los marcadores moleculares se han utilizado principalmente en estudios de diversidad genética, pero en algunos casos también para el estudio de estabilidad genética en el cultivo de plantas *in vitro* (Araújo *et al.* 2001, Patzak 2003, Sahijram *et al.* 2003).

Picca *et al.* (2004) clasifican las técnicas basadas en marcadores moleculares de ADN de acuerdo con la naturaleza del procedimiento que conllevan en: (1) Marcadores basados en hibridación del ADN, (2) Marcadores basados en la amplificación de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) y (3) Marcadores mixtos que utilizan métodos de hibridación y amplificación. Los genes conocidos de plantas transgénicas se pueden utilizar también como marcadores moleculares; sin embargo, no es común encontrar trabajos que refieran el uso de transgenes para detectar variación somaclonal (Bellini *et al.* 1989).

Varios autores recomiendan que, al usar marcadores moleculares, deben combinarse al menos dos metodologías para una corroboración exacta y así evitar falsos positivos (Ooms *et al.* 1987, Speckaert y Jacobs 1988, Jiménez 1996, Osuji *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998, Tremblay *et al.* 1999, Feuser *et al.* 2003, Kubis *et al.* 2003).

Marcadores basados en hibridación del ADN

Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Restriction fragment length polymorphisms)

Los RFLPs son polimorfismos entre individuos dados por el tamaño de los fragmentos que son cortados por enzimas de restricción, las cuales cortan en sitios específicos del ADN al reconocer una secuencia particular de cuatro a seis pares de bases (Brettschneider 1998, Aravanopoulos 2003). Mediante *Southern blot* se transfieren los fragmentos de ADN separados según su movilidad electroforética a una membrana y luego se hibridan con sondas específicas marcadas (Peerbolte *et al.* 1987, Rode *et al.* 1987). Los RFLP tienen la ventaja de ser altamente reproducibles debido a que las secuencias son cortadas en sitios determinados (Brettschneider 1998).

Cuando Larkin y Scrowcroft (1981) definieron el concepto de variación somaclonal, varios autores empezaron a utilizar los RFLP para detectarla. Las primeras investigaciones en ese sentido se hicieron en explantes de papa (*Solanum tuberosum*) provenientes de protoplastos (Landsmann y Uhrig 1985) y en dobles haploides de trigo (*Triticum aestivum*) (Rode *et al.* 1985). Además, se han utilizado RFLPs para el monitoreo de clones en el banco de germoplasma *in vitro*

del utilizado RFLPs para el monitoreo de clones en el banco de germoplasma *in vitro* de Biodiversity International (antes Centro Internacional para Recursos Vegetales Genéticos, IPGRI por sus siglas en inglés) con el fin de asegurarse que se están conservando plantas que mantienen íntegras sus características fenotípicas (Withers *et al.* 1990). También se ha empleado esta técnica para estudios de la variación somaclonal *in vitro*, clonación de genes y la detección de transposones en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Hille *et al.* 1989). Otros ejemplos relacionados con el empleo de esta técnica se presentan en el Cuadro 1.

Sin embargo, este marcador presenta una serie de desventajas, como son que requiere cantidades altas de ADN (Brettschneider 1998, Nunome *et al.* 2001, Polanco y Ruiz 2002), así como de infraestructura adecuada para los casos en que se trabaja con radioactividad para el marcaje específico de las secuencias de interés (Picca *et al.* 2004). El marcaje con luminiscencia (mediante el uso de digoxigenina, por ejemplo) puede evitar el uso de radioactividad (Neuhaus-Url y Neuhaus 1993, Ma *et al.* 2008).

Marcadores moleculares basados en PCR

La PCR está basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento de ADN comprendido entre secuencias complementarias a dos oligonucleótidos llamados imprimadores (también conocidos como iniciadores o cebadores). Este proceso es realizado por una enzima ADN polimerasa termoestable (Aravanopoulos 2003, Picca *et al.* 2004).

Amplificación aleatoria del ADN polimórfico o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La RAPD consiste en la amplificación de secuencias de ADN con un iniciador de una longitud de diez pares de bases con secuencia aleatoria (decámero), que se hibrida con el ADN (Williams *et al.* 1990, Araújo *et al.* 2001). Posteriormente, los fragmentos de ADN son separados según su movilidad electroforética y visualizados en un gel de agarosa o poliacrilamida (Hames y Rickwood 1990, Williams *et al.* 1990, Curso Técnicas 2006). Este último tiene mayor resolución. Diferencias en el patrón de bandas detectadas entre individuos evidencia diferencias en su secuencia de bases (Picca *et al.* 2004). Esta técnica es simple y efectiva, y permite determinar los polimorfismos en gran cantidad

Cuadro 1. Ejemplos de trabajos en los cuales la técnica RFLP ha sido empleada para detectar variación somaclonal (ordenados alfabéticamente de acuerdo al cultivo). En algunos ejemplos se han utilizado otras técnicas para su comprobación. cvs: cultivares.

Técnica molecular	Cultivo	Objetivo	Resultado	Referencia
RFLP / isoenzimas	<i>Beta vulgaris</i> (remolacha)	Determinación de la variación somaclonal en plantas regeneradas de callos, peciolo y hojas	Se detectó 0,05-0,1% de variación somaclonal	Sabir <i>et al.</i> (1992)
RFLP	<i>Elaeis guineensis</i> (palma aceitera)	Caracterización de dos marcadores en callos que muestran variación somaclonal	Variación somaclonal en callos compactos y con crecimiento rápido (5 y 100%, respectivamente), relacionada con metilación del ADN genómico, que produce posteriormente flores anormales	Jaligot <i>et al.</i> (2002)
RFLP	<i>Glycine max</i> (soya)	Caracterización de cultivares y determinación de los posibles orígenes de rearrreglos genéticos	No se detectó variación somaclonal en ninguna de las suspensiones celulares de soya evaluadas.	Apuya <i>et al.</i> (1988)
RFLP	<i>Glycine max</i> (soya)	Detección de variación somaclonal	Variación genética es consecuencia de eventos recombinantes y del estrés durante la preparación de suspensiones celulares	Roth <i>et al.</i> (1989)
RFLP	<i>Hordeum spontaneum</i> (cebada silvestre)	Determinación de variación somaclonal en plantas provenientes de callo derivado de embriones inmaduros	Se detectó variación somaclonal en los embriones y en plantas provenientes de callos de embriones inmaduros	Breiman <i>et al.</i> (1987)
RFLP / RAPD	<i>Nicotiana tabacum</i> L. (tabaco)	Estudio de la tolerancia al herbicida atrazina con relación a mutaciones puntuales y estrés	Se determinaron los mecanismos de resistencia a atrazina en plantas que presentan variación somaclonal	Bettini <i>et al.</i> (1998)

de muestras (Martín *et al.* 2002). Sin embargo, muchas veces es necesario evaluar gran cantidad de iniciadores antes de encontrar aquellos que son informativos (en algunos casos se han probado más de 8.900 iniciadores hasta encontrar la combinación adecuada) (Nunome *et al.* 2001, Feuser *et al.* 2003, Gostimsky *et al.* 2005).

Los RAPDs permitieron valorar la variación somaclonal de plantas de *Hypericum perforatum*, planta

que produce compuestos con actividad anticancerígena y antiviral (hipericina y pseudohipericina), obtenidas de hojas y semillas en cultivo *in vitro* (Halušková y Košuth 2003). En el caso de *Phoenix dactylifera* (dátil), la mejor técnica para la detección de variación somaclonal fue RAPD, frente a los RFLP y Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Kunert *et al.* 2003). Otros ejemplos del uso

de RAPD para la detección de la variación somaclonal se presentan en el Cuadro 2.

Región amplificada de una secuencia caracterizada o SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

Los SCAR son fragmentos de ADN amplificados por PCR mediante la utilización de imprimadores específicos de 15 a 30 pares de bases, diseñados de acuerdo con la secuencia obtenida de marcadores RAPD polimórficos que se desea hacer aún más específicos (Deputy *et al.* 2002, Gupta *et al.* 2002, Chaves-Bedoya y Núñez 2007). Por ejemplo, en banano, se desarrolló un marcador SCAR específico para la detección de variantes somaclonales enanos utilizando secuencias previamente identificadas por RAPD (Ramage *et al.* 2004).

Polimorfismo de amplificación sensible a metilación o MSAP (Methylation-sensitive amplification polymorphism)

Esta técnica está basada en una doble digestión, primero con una enzima sensible a la presencia de sitios

de metilación (*HpaII* o *MspI*) y luego con una enzima insensible a la metilación (*EcoRI*). Después, los fragmentos son ligados a adaptadores en la doble banda y se amplifica la secuencia con imprimadores complementarios a éstos. Para asegurar que los fragmentos generados son los sensibles a sitios de fácil metilación CCGG (C: citosina, G: guanina), el iniciador es marcado con [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (Jaligot *et al.* 2004) o $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Kubis *et al.* 2003) y, posteriormente, los productos son separados en un gel de poliacrilamida. Los niveles de metilación son medidos en columnas de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) (Jaligot *et al.* 2000, Kubis *et al.* 2003, Jaligot *et al.* 2004) o con el método SssI metilasa descrito por Schmitt *et al.* (1997) y Jaligot *et al.* (2000). Este método compara el estatus de metilación de las secuencias CCGG y ha sido usado ampliamente en palma aceitera. En plantas desarrolladas por embriogénesis somática, se determinó la variación somaclonal y se detectaron polimorfismos causados por metilación en las secuencias CCGG que se relacionan con la producción de órganos florales anormales (Jaligot *et al.* 2004). Esta técnica también se utilizó en papa (*Solanum tuberosum*) para evaluar plantas micropropagadas (Joyce y Cassells

Cuadro 2. Ejemplos de trabajos en los cuales la técnica RAPD ha sido empleada para detectar variación somaclonal. En algunos ejemplos se han utilizado otras técnicas para su comprobación.

Técnica molecular	Cultivo	Objetivo	Resultado	Referencia
RAPD / SSR	<i>Actinidia deliciosa</i> (kiwi)	Comparar las técnicas moleculares RAPD y SSR para detectar variación genética	Se detectó variación somaclonal en plantas micropropagadas y se recomendó combinar técnicas moleculares para una comprobación más fidedigna	Palombi y Damiano (2002)
RAPD / análisis citológico	<i>Allium sativum</i> (ajo)	Detectar la variación somaclonal en callos y plantas <i>in vitro</i>	Se encontró que la frecuencia de variación fue dependiente del cultivar con valores entre 0,35 y 1%.	Al-Zahim <i>et al.</i> (1999)
RAPD / isoenzimas	<i>Ananas comosus</i> (piña)	Determinar las variaciones en plantas micropropagadas mediante dos sistemas	En el sistema estático se presentó 2% de variación somaclonal y en el sistema de inmersión temporal 4%	Feuser <i>et al.</i> (2003)
RAPD / AFLP	<i>Arachis retusa</i>	Determinar la estabilidad genética en plantas regeneradas a partir de cotiledones y embriones	No hubo evidencia de variación somaclonal	Gagliardi <i>et al.</i> (2007)
RAPD / Análisis citogenéticos	<i>Asparagus officinalis</i> cv. Argenteuil	Detectar variación somaclonal en plantas provenientes de embriones somáticos	No se encontró variación somaclonal	Raimondi <i>et al.</i> (2001)

Continúa...

Continuación...

RAPD	<i>Begonia x hiemalis</i>	Seleccionar cultivares y plantas regeneradas <i>in vitro</i> (provenientes de callos) sin variación somaclonal	RAPD no fue lo suficientemente sensible para la detección de variación somaclonal. La aparición de variación somaclonal fue detectada por medio de ensayos fenotípicos en campo	Bouman y de Klerk (2001)
RAPD	<i>Beta vulgaris</i> (remolacha)	Determinar la variación somaclonal en plantas regeneradas de tallos adventicios	Se detectó 0,05% de variación somaclonal	Munthali <i>et al.</i> (1996)
RAPD	<i>Brassica oleracea</i> (brócoli var. <i>italica</i>)	Analizar la estabilidad genética de las plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos	Se demostró la estabilidad genética de las plantas regeneradas	Qin <i>et al.</i> (2007)
RAPD	<i>Cedrus atlantica</i> y <i>C. libani</i>	Determinar la estabilidad genética en tallos propagados <i>in vitro</i> a través yemas axilares	Se demostró similitud del 97 – 100 % entre las plantas madres y las plantas derivadas del cultivo de tejidos. No se encontró variación somaclonal.	Renau-Morata <i>et al.</i> (2005)
RAPD	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Caracterizar y determinar la variación somaclonal en cultivares comerciales	Se detectó variación somaclonal después de un mes de cultivo	Martín <i>et al.</i> (2002)
RAPD	<i>Curcuma longa</i> cv. Prathibha	Caracterizar y determinar la estabilidad genética en plantas conservadas en medio de cultivo <i>in vitro</i> con sustitutos de bajo costo	No se detectó variación somaclonal significativa	Tyagi <i>et al.</i> (2007)
RAPD	<i>Drosera anglica</i> y <i>D. binata</i>	Determinar la estabilidad genética en plantas <i>in vitro</i> provenientes de yemas laterales	En <i>D. anglica</i> , se detectó 0,08% de variación somaclonal y en <i>D. binata</i> no se detectó variación	Kawiak y Lojkowska (2004)
RAPD	<i>Elaeis guineensis</i> (palma aceitera)	Clonar y caracterizar el gen EDGA1 (gen que codifica la proteína defensina, con propiedad antifungal). EDGA1 se utilizó como marcador en eventos somaclonales	Se encontró que la proteína defensina producida en las inflorescencias está relacionada a cambios epigenéticos en la morfología floral	Tregear <i>et al.</i> (2002)
RAPD	<i>Macadamia tetraphylla</i> (macadamia)	Evaluar la estabilidad clonal de plantas regeneradas <i>in vitro</i> y micropropagadas axilarmente	No se detectó variación somaclonal en las plantas micropropagadas	Mulwa y Bhalla (2007)
RAPD	<i>Malus pumila</i> (manzana)	Determinar la estabilidad genética en plantas micropropagadas del patrón MM106	Se favoreció la aparición de variación somaclonal, debido al estrés causado por las condiciones <i>in vitro</i> .	Modgil <i>et al.</i> (2005)
RAPD	<i>Musa</i> spp. (banano, grupo Cavendish)	Seleccionar variedades enanas de cavendish	Se encontró 28,89% de polimorfismos en plantas normales y enanas. Marcador permitió la detección temprana de enanismo.	Damasco <i>et al.</i> (1996)
RAPD	<i>Musa</i> spp. (banano)	Evaluar el variante somaclonal CIEN BTA-03, resistente a Sigatoka Amarilla y sus clones	Dentro de los clones del variante CEN BTA-03, se encontraron dos clones resistentes y dos clones susceptibles	Vidal y García (2000)

Continúa...

Continuación...

RAPD	<i>Musa</i> spp. (banano y plátano)	Caracterizar la variabilidad genética	Imprimadores con alto grado de polimorfismo detectaron menos de ocho variantes.	Peteira <i>et al.</i> (2003)
RAPD	<i>Musa</i> spp. (banano, Cavendish)	Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la variación somaclonal	Ácido indol-butírico y ácido indol-acético, en combinación con bencinoaminopurina, indujeron mayor tasa de multiplicación y mayor variación somaclonal.	Bairu <i>et al.</i> (2006)
RAPD / SSR	<i>Musa</i> spp.	Caracterizar y determinar la variación somaclonal <i>in vitro</i>	Se encontró homogeneidad entre los resultados de RAPD y SSR. No se detectó variación somaclonal	Venkatachalam <i>et al.</i> (2007)
RAPD	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Detectar variación somaclonal en plantas provenientes de callos	Se detectó la aparición de mutaciones recesivas y variaciones en el ADN genómico. Los niveles de variación del ADN predominaron en secuencias altamente repetidas y en algunos casos sin efectos en el fenotipo	Godwin <i>et al.</i> (1997)
RAPD	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Evaluar somaclones resistentes a <i>Pyricularia grisea</i>	Se encontró que, de 17 somaclones, cinco fueron resistentes a <i>P. grisea</i>	Araújo <i>et al.</i> (2001)
RAPD	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Evaluar resistencia a <i>Pyricularia grisea</i> y detectar variación somaclonal	Variantes somaclonales del cv. IC47 eran susceptibles a la enfermedad.	Araújo <i>et al.</i> (2004)
RAPD	<i>Phalaenopsis</i> sp. ("True Lady")	Detectar la variación somaclonal en las plantas propagadas <i>in vitro</i>	Se detectó 1,5 % de variación somaclonal, evidente por alteraciones en la morfología floral	Chen <i>et al.</i> (1998)
RAPD	<i>Picea abies</i> (piceas de Noruega)	Determinar la fidelidad genética y detectar variación somaclonal	No se encontró variación somaclonal en las plantas regeneradas	Heinze y Schmidt (1995)
RAPD	<i>Picea abies</i> (piceas de Noruega)	Evaluar la variación somaclonal en embriones somáticos en un banco de germoplasma	No se encontró variación somaclonal	Fourré <i>et al.</i> (1997)
RAPD	<i>Pinus patula</i>	Evaluar uniformidad de plántulas provenientes de ápices de tallos vegetativos	Se caracterizaron las plantas con diferentes imprimadores y no se detectó variación somaclonal	Malabadi <i>et al.</i> (2006)
RAPD	<i>Prunus persica</i> (melocotón)	Determinar la variación somaclonal de plantas regeneradas de callos embriogénicos	Se encontró que la frecuencia de la variación somaclonal fue dependiente del genotipo	Hashmi <i>et al.</i> (1997)
RAPD	<i>Prunus dulcis</i> (almondra) <i>P. dulcis</i> x <i>P. persica</i>	Evaluar la estabilidad genética de plantas en cultivo <i>in vitro</i> y criopreservadas	No se detectó variación somaclonal	Channuntapipat <i>et al.</i> (2003)
RAPD	<i>Quercus suber</i> (roble, alcornoque)	Determinar la variación somaclonal en plantas regeneradas de callos embriogénicos y diferenciar genotipos	No se encontró variación somaclonal entre clones, la información obtenida por medio de RAPD, se utilizó para diferenciar genotipos	Gallego <i>et al.</i> (1997)

cv: cultivar, cvs: cultivares.

2002). Debido a que esta técnica es relativamente nueva, es a partir del año 2000 que comienzan a aparecer

las primeras publicaciones sobre su aplicación para la detección de variación somaclonal.

Marcadores mixtos

Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

Esta técnica es considerada como una combinación entre RFLP y PCR (Picca *et al.* 2004) debido a que: (a) involucra dos enzimas de restricción, (b) se realiza ligamiento de adaptadores en ambos extremos, y (c) ocurre amplificación de segmentos de ADN con imprimadores específicos, diseñados tomando en consideración las secuencias de los sitios de restricción de las enzimas y de los adaptadores empleados (Vos *et al.* 1995, Sánchez-Teyer *et al.* 2003, Picca *et al.* 2004). Una vez que los fragmentos han sido amplificados, se visualizan en geles de poliacrilamida (Hames y Rickwood 1990, Vos *et al.* 1995, Picca *et al.* 2004). Los AFLPs presentan un alto poder de detección de variabilidad genética debido a que exploran simultáneamente la presencia o ausencia de sitios de restricción, como en los RFLPs, y la ocurrencia o no ocurrencia de amplificación, como en los RAPDs. Este marcador dominante es una herramienta mucho más poderosa que los RAPDs porque permite amplificar secuencias más largas de oligonucleótidos (lo que incrementa significativamente la especificidad), no requiere información previa de la secuencia del ADN (Picca *et al.* 2004) y es altamente reproducible (Azofeifa-Delgado 2006). Los AFLPs han sido utilizados para detectar variación somaclonal en plátano “Curare enano” (*Musa spp.*) *in vitro*. En este cultivo es frecuente la aparición de variación somaclonal durante la fase *in vitro*, por lo que es imprescindible este tipo de análisis (Sahjiram *et al.* 2003). Además, los AFLPs han sido utilizados para estudios de variación somaclonal en *Arabidopsis thaliana* (Polanco y Ruiz 2002), así como para detectar genes de resistencia a enfermedades en variantes somaclonales de papa (*Solanum tuberosum*) (Solomon-Blackburn y Barker 2001). Otros ejemplos en cultivos comerciales se presentan en los Cuadros 2 y 3.

Secuencias simples repetidas, microsatélites o SSR (Short Sequence Repeats)

Los SSRs son regiones hipervariables que se componen de secuencias de unos pocos pares de bases (uno

a cuatro) repetidas muchas veces. Estas secuencias se amplifican por medio de PCR utilizando imprimadores específicos para las regiones que flanquean las secuencias repetidas. La interpretación de los polimorfismos está basada en la variabilidad del número de repeticiones y, en consecuencia, por el tamaño de los fragmentos amplificados (Aravanopoulos 2003, Picca *et al.* 2004). Esta técnica permite detectar diferencias hasta de una base, que corresponde al mínimo de longitud en un polimorfismo (Picca *et al.* 2004). Los SSRs tienen ventajas sobre los RAPDs debido a que son codominantes, es factible la semiautomatización y pueden ser identificados en bases de datos (Hernández 2005). Sin embargo, esta técnica requiere de mucho trabajo debido a que se puede analizar sólo un locus a la vez (Azofeifa-Delgado 2006). Por ejemplo, los SSRs han sido utilizados para determinar variación somaclonal en la especie arborecente *Populus tremuloides*, donde se evaluó la fidelidad clonal *in vitro* de las plantas (Rahman y Rajora 2001). Otros ejemplos donde los microsatélites han sido utilizados para determinar variación somaclonal y han sido comparados con otras técnicas moleculares se presentan en el Cuadro 3.

Los STS o STMS (por su nombre en inglés “Sequence Tagged Sites o Sequence Tagged Microsatellite Sites-STMS”) son otro tipo de microsatélite. Los STS siguen los mismos principios que el procedimiento de los SSR. Los STS se diferencian únicamente porque utilizan imprimadores un poco más grandes (alrededor de 20 pares de bases) (Patzak 2003). Debido a que es una técnica relativamente nueva, pocos autores hacen referencia a su uso con la detección y evaluación de variación somaclonal.

Como se evidencia en el presente trabajo, varias técnicas moleculares se han utilizado para la detección de variantes somaclonales en gran cantidad de especies vegetales. Es importante considerar que la utilización de las herramientas descritas con anterioridad permite detectar cambios genéticos aun en etapas tempranas de cultivo. Sin embargo, hay que tomar en cuenta también que, dependiendo de la técnica utilizada y las enzimas de restricción o imprimadores o seleccionados, el análisis por medio de técnicas moleculares puede no evidenciar ciertos variantes fenotípicos, por el solo hecho de que no se está estudiando la región del genoma donde ocurrieron las modificaciones. También, y como se definió al inicio de este trabajo, hay que considerar que la variación somaclonal contempla, además de los cambios genéticos, también aquellos

Cuadro 3. Ejemplos de trabajos en los cuales la técnica AFLP y/o microsatélites han sido empleados para detectar variación somaclonal. En algunos ejemplos se han utilizado otras técnicas para su corroboración.

Técnica molecular	Cultivo	Objetivo	Resultado	Referencia
AFLP	<i>Actinidia deliciosa</i> (kiwi)	Evaluar la variación genética en plantas regeneradas de callos	Callos provenientes de hojas o tallos presentaron cierta variación entre clones (similitud del 73-90%).	Prado <i>et al.</i> (2007)
AFLP	<i>Coffea arabica</i> y <i>C. canephora</i> (café)	Evaluar la variación somaclonal en embriones somáticos de híbridos mejorados	Dependiendo del genotipo, se encontró entre 3% y 10% de variación somaclonal	Etienne <i>et al.</i> (2002)
AFLP / Southern Blot	<i>Elaeis guinensis</i> (palma aceitera)	Evaluar variación en plantas regeneradas y la sensibilidad a la metilación enzimática	Durante el cultivo de tejidos se redujo la metilación	Matthes <i>et al.</i> (2001)
AFLP / SSR	<i>Glycine max</i> (soya)	Evaluar variación somaclonal en líneas comerciales cultivadas <i>in vitro</i> a partir de cotiledones	En el proceso de regeneración de los nudos cotiledonares se produjo mutaciones. Los variantes somaclonales no presentaron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas silvestres al ser evaluados en campo	Jung <i>et al.</i> (2004)
AFLP	<i>Hordeum vulgare</i> (cebada)	Evaluar la estabilidad genética en plantas derivadas de androgénesis y embriogénesis somática	Se encontró un promedio del 6% de variación somaclonal	Bednarek <i>et al.</i> (2007)
AFLP/ SSR / RFLP / RAPD/STS	<i>Humulus lupulus</i> (lúpulo)	Evaluar la variabilidad somaclonal en meristemos de plantas <i>in vitro</i> antes y después de termoterapia	Termoterapia incrementó frecuencia en cambios moleculares de 54 a 70 %. Únicamente en dos clones se detectaron diferencias moleculares al emplear SSR y RAPD. Otras técnicas no evidenciaron diferencias moleculares en ninguno de los clones.	Patzak (2003)
AFLP	<i>Papaver bracteatum</i> (adormidera de Siberia)	Evaluar la estabilidad genética en plantas regeneradas de callos	No se detectó variación somaclonal y se determinó que las plantas eran híbridas	Carolan <i>et al.</i> (2002)

Continúa...

Continuación...

SSR	<i>Quercus suber</i> (roble, alcornoque)	Determinar la estabilidad genética de callos embriogénicos provenientes de plantas adultas y jóvenes	Se observó los mismos patrones en todas las muestras analizadas, excepto en un genotipo que presentó 2,5% de mutación	Lopes <i>et al.</i> (2006)
AFLP	<i>Secale cereale</i> L. (centeno)	Evaluar factores inductores de la variación somaclonal, así como frecuencia, distribución y mecanismos	Se encontró dos a 90 cambios por planta. En dos plantas se concentró el 49% de los cambios. La mitad de las plantas regeneradas presentaron seis o menos cambios por planta	Puente <i>et al.</i> (2004)
AFLP / microsatélites / RAPD	<i>Saccharum</i> sp. (caña de azúcar)	Evaluación de la variación somaclonal en plantas transgénicas	Plantas provenientes de cultivos celulares transgénicos presentaron mayor variación somaclonal que cultivos no transgénicos	Arencibia <i>et al.</i> (1999)
AFLP	<i>Syngonium podophyllum</i>	Analizar las diferencias genéticas entre cultivares obtenidos de variantes somaclonales	Variantes somaclonales presentaron diferencias genéticas de 0,4%-1,2%	Chen <i>et al.</i> (2006)

cv: cultivar, cvs: cultivares

cambios de naturaleza epigenética, que producen alteraciones en el fenotipo. La mayoría de las técnicas descritas anteriormente no permitiría discriminar estos variantes. Por otro lado, puede haber variantes somaclonales, producto de cambios en la secuencia de ADN de regiones no codificantes, que se identifiquen por medio de marcadores moleculares, pero que no tengan ningún efecto sobre el fenotipo. Desde el punto de vista de una operación comercial enfocada en la micropropagación de plantas, este tipo de cambios no constituye un problema para su actividad. Si bien la utilización de técnicas moleculares ha demostrado ser útil para la detección de variación somaclonal, hay que considerar que puede dejar variantes sin detectar (falsos negativos), o bien, detectar variación que no tiene ninguna consecuencia, al no producir cambios fenotípicos, y que podría conllevar al descarte prematuro de plantas fenotípicamente idénticas a las originales.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, M; Shrivastava, N; Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Ahloowalia, BS. 1998. *In-vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. *In: Jain, SM; Brar, DS. Ahloowalia, BS. eds. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht, Kluwer. p. 293-309.*
- Ahloowalia, BS; Sherington, J. 1985. Transmission of somaclonal variation in wheat. *Euphytica* 34: 525-537.
- Al-Zahim, MA; Ford-Lloyd, BV; Newbury, HJ. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports* 18: 473-477.

- Anu, A; Babu, KN; Peter, KV. 2004. Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 261–267.
- Apuya, NR; Frazier, BL; Keim, P; Jill-Roth, E; Lark, KG. 1988. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) merrill. Theoretical and Applied Genetics 75: 889–901.
- Araújo, LG; Prabhu, AS; Filippi, MC; Chaves, LJ. 2001. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 165–172.
- Araújo, LG; Prabhu, AS; Arraes-Pereira, PA. 2004. RAPD marker linked to a gene conferring resistance to race IB-9 of *Pyricularia grisea* in somaclones of the rice cultivar Araguaia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 151–158.
- Aravanopoulos, FA. 2003. Molecular identification of micropropagated plants. Acta Horticulturae 616: 25–47.
- Arencibia, AD; Carmona, ER; Cornide, MT; Castiglione, S; O'Reilly, J; China, A; Oramas, P; Sala, F. 1999. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. Transgenic Research 8: 349–360.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17: 221–242.
- Bairu, M; Fennell, C; 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.
- Bednarek, PT; Orłowska, R; Koebner, RMD; Zimny, J. 2007. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). BMC Plant Biology 7: 10.
- Bellini, C.; Guerche, P.; Spielmann, A.; Goujaud, J.; Lesaint, C.; Caboche, M. 1989. Genetic analysis of transgenic tobacco plants obtained by liposome-mediated transformation: absence of evidence for the mutagenic effect of inserted sequences in sixty characterized transformants. Journal of Heredity 80: 361–367.
- Bettini, P; Chiarugi, P; Buiatti, M. 1998. An *in vitro* molecular study of the *Nicotiana tabacum* L. genome in the presence or absence of the herbicide atrazine. Theoretical and Applied Genetics 96: 242–250.
- Bouman, H; de Klerk, GJ. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. Theoretical and Applied Genetics 102: 111–117
- Brar, SM; Brar, DS. 1998. Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In Jain, SM; Brar, DS. eds. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht, Kluwer. p. 15-37.
- Breiman, A; Rotem-Abarbanell, D; Karp, A; Shaskin, H. 1987. Heritable somaclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*). Theoretical and Applied Genetics 74: 104–112.
- Brettschneider, R. 1998. RFLP analysis. In Karp, A; Isaac, P.G.; Ingram, D.S. eds. Molecular tools for screening biodiversity. Londres, Chapman y Hall. p. 85-95.
- Campa, A; Pérez, E; Giráldez, R; Ferreira, JJ. 2004. Utilización de las proteínas de semilla como marcadores genéticos para la caracterización de la colección de judías del Serida. In Congreso de Mejora Genética de Plantas (21 – 24 Setiembre, 2004, España). León, España. Universidad de León. Actas de Horticultura 41: 313–316.
- Cardone, S; Olmos, S; Echenique, V. 2004. Variación somaclonal. In Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTA, Argentina. p. 81-96.
- Carolan, JC; Hook, ILI; Walsh, JJ; Hodkinson, TR. 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of *in vitro*-cultured *Papaver bracteatum* (Section *Oxytona*). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 38: 300–307.
- Cassells, CA; Curry, RF. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in

- plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145–157.
- Channuntapipat, C; Sedgley, M; Collins, G. 2003. Changes in methylation and structure of DNA from almond tissues during *in vitro* culture and cryopreservation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 890–897.
- Chaves-Bedoya, G; Núñez, V. 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica* 153: 215–220.
- Chen, J; Henny, RJ; Devanand, PS; Chao, CT. 2006. AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants. *Plant Cell Reports* 24: 743–749.
- Chen, WH; Chen, TM; Fu, YM; Hsich, RM; Chen, WS. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 18: 7–13.
- Cruzan, MB. 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology* 79: 400–412.
- Curso Técnicas moleculares en la acuicultura (3-14 de Julio, 2006, Ecuador). (Manual práctico). eds. Bayot, B.; Betancourt, I; Cedeño, R; Echeverría, R; Melenam J; Muñoz, M; Nieto, J; Rodríguez, H; Rodríguez, J; Panchana, F; Sotomayor, M; Vivanco, Y. San Pedro de Manglaralto, Ecuador, Fundación CENAIM-ESPOL.
- Damasco, OP; Graham, GC; Henry, RJ; Adkins, SW; Smith, MK; Goodwin, ID. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) selection of dwarf off-types in micropropagated cavendish (*Musa* spp.) bananas. *Plant Cell Reports* 16: 118–123.
- Deputy, JC; Ming, R; Mam H; Liu, Z; Fitch, MMM.; Wang, M; Manshardt, R; Stiles, JI. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 107-111.
- Etienne, H; Annthony, F; Dussert, S; Fernandez, D; Lashermes, P; Bertrand, B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 129-138.
- Feuser, S; Meler, K; Daquinta, M; Guerra, MP; Nodari, RO. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 221–227.
- Fourré, JL; Berger, P; Niquet, L; André, P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 159-169.
- Gagliardi, RF; Hanai, LR; Pacheco, G; Oliveira, CA; Carneiro, LA; Montenegro-Valls, JF; Mansur, E; Vieira, LC. 2007. Assessment of genetic stability among *in vitro* plants of *Arachis retusa* using RAPD and AFLP markers for germplasm preservation. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 307–312.
- Gallego, FJ; Martínez, I; Celestino, C; Toribio, M. 1997. Testing somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. somatic embryos. *International Journal of Plant Sciences* 158: 563–567.
- George, EF. 1993. Variation in cultures and regenerated plants. *In* George, E.F. ed. *Plant propagation by tissue culture*. 2 ed. Edington, R.U., Exegetics. p. 3-36.
- Godwin, ID; Sangduen, N; Kunanuvatchaidach, R; Piperidis, G; Adkins, SW. 1997. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var *indica*) somaclonal progenies. *Plant Cell Reports* 16: 320–324.
- Gostimsky, SA; Kokaeva, ZG; Konovalov, FA. 2005. Studying plant genome variation using molecular markers. *Russian Journal of Genetics* 41: 378-388.
- Gupta, PK; Varshney, RK 1999. Molecular markers for genetic fidelity during micropropagation and germplasm conservation? *Current Science* 76: 1308–1310.
- Gupta, PK; Varshney, RK; Prasad, M. 2002. Molecular markers: principles and methodology. *In*: Jain, SM; Brar,

- DS; Ahloowalia, BS. eds. Molecular techniques in crop improvement. Dordrecht, Holanda, Kluwer. p. 9-54.
- Halušková, J; Košuth, J. 2003. RAPD analysis of somaclonal and natural DNA variation in *Hypericum perforatum* L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 45: 101–104.
- Hames, BD; Rickwood, D. 1990. Gel electrophoresis of proteins. Oxford, R.U., Oxford University Press. 383 p.
- Hammerschlag, F; Garcés, S; Koch-Dean, M; Ray, S; Lewers, K; Maas, J; Smith, BJ. 2006. *In vitro* response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletotrichum acutatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 255–261.
- Hashmi, G; Huettel, R; Meyer, R; Krusberg, L; Hammerschlag, F. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. Plant Cell Reports 16: 624–627.
- Heinze, B; Schmidt, J. 1995. Monitoring genetic fidelity vs. somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. Euphytica 85: 341–345.
- Hernández, P. 2005. Comparison among available marker systems for cereal introgression breeding: A practical perspective. Euphytica 146: 95–100.
- Hille, J; Koornneef, M; Ramanna, MS; Zabel, P. 1989. Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. Euphytica 42: 1–23.
- Jain, SM. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153–166.
- Jaligot, E; Rival, A; Beulé, T; Dussert, S; Verdeil, JL. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. Plant Cell Reports 19: 684–690.
- Jaligot, E; Beulé, T; Rival, A. 2002. Methylation-sensitive RFLPs: characterization of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. Theoretical and Applied Genetics 104: 1263–1269.
- Jaligot, E; Beulé, T; Baurens, FC; Billotte, N; Rival, A. 2004. Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the “mantled” variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Genome 47: 224–228.
- Jarret, RL; Litz, RE. 1986. Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. Euphytica 35: 539-549.
- Jiménez, VM. 1996. El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento genético. Agronomía Costarricense 20: 187-204.
- Joyce, SM; Cassells, AC. 2002. Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 125-137
- Jung, HS; Van, K; Kim, MY; Lee, SH. 2004. Identification of DNA variations using AFLP and SSR markers in soybean somaclonal variants. Korean Journal of Crop Science 49: 1-4
- Kaeppler, SM; Kaeppler, HF; Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43: 179–188.
- Kawiak, A; Lojkowska, E. 2004. Application of RAPD in the determination of genetic fidelity in micropropagated *Drosera* plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 40: 592–595.
- Kubis, SE; Castilho, AMMF; Vershinin, AV; Heslop-Harrison, JS. 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. Plant Molecular Biology 52: 69–79.
- Kunert, KJ; Baaziz, M; Cullis, CA. 2003. Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: A literature review. Emirates Journal of Agricultural Sciences 15: 1–16.
- Landsmann, J; Uhrig, H. 1985. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. Theoretical and Applied Genetics 71: 500–505.
- Larkin, PJ; Scrowcroft, WR. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant

- improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197–214.
- Lopes, T; Pinto, G; Loureiro, J; Costa, A; Santos, C. 2006. Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. *Tree Physiology* 26: 1145–1152.
- Ma, Y; Su, H; Zhao, G; Dai, H; Gao, X; Li, H; Zhang, Z. 2008. Isolation and characterization of genomic retrotransposon sequences from octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Cell Reports* 27 499-507.
- Maddock, SE; Risiott, R; Parmar, S; Jones, MGK; Shewry, PR. 1985. Somaclonal variation in the gliadin patterns of grains of regenerated wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 36: 1976–1984.
- Malabadi, RB; Hills, PN; van Staden, J. 2006. RAPD assessment of clonal identity of somatic seedlings derived from vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *South African Journal of Botany* 72: 181-183.
- Martín, C; Uberhuaga, E; Pérez, C. 2002. Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica* 127: 247–253.
- Martín-Cuevas, A; Martín, LM; Álvarez, JB. 2004. Las proteínas de reserva como marcadores moleculares en el castaño (*Castanea sativa* Miller). In Congreso de Mejora Genética de Plantas (21 – 24 Setiembre, 2004, España). León, España. Universidad de León. *Actas de Horticultura* 41: 245–248.
- Matthes, M; Singh, R; Cheah, S.-C; Karp, A. 2001. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 971–979.
- Mehta, YR; Angra, D. 2000. Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 23: 617-622.
- Modgil, M; Mahajan, K; Chakrabarti, SK; Sharma, DR; Sobti, RC. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Scientia Horticulturae* 104: 151–160.
- Mujib, A. 2004. *In vitro* variability in tissue culture: a fresh look. In Mujib, A; Myeong-je, C; Predieri, S; Banerjee, S. eds. *In vitro* application in crop improvement. Enfield, EUA, Science Publishers. p. 261-271.
- Müller-Starck, G. 1998. Isozymes. In: Karp, A. Isaac, P.G. Ingram, DS. eds. *Molecular tools for screening biodiversity*, Londres, Chapman y Hall. p. 75–81.
- Mulwa, RMS; Bhalla, PL. 2007. Assessment of clonal stability of *in vitro* regenerated shoots of *Macadamia tetraphylla* by RAPD analysis. *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 253-257.
- Munthali, MT; Nweburru, HJ; Ford-Lloyd, BV. 1996. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Reports* 15: 474-478.
- Navarro, W; Perea, M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. EUNA, Heredia, CR. 105 p.
- Neuhaus-Url, G; Neuhaus, G. 1993. The use of nonradioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity. *Transgenic Research* 2: 115-120.
- Noro, Y; Takano-Shimizu, T; Syono, S; Kishima, Y; Sano, Y. 2007. Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the *EPSPs-RPS20* region. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 705–711.
- Nunome, T; Ishiguro, K; Yoshida, T; Hirai, M. 2001. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melogena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breeding Science* 51: 19-26.
- Ooms, G; Burrell, MM; Karp, A; Bevan, M; Hille, J. 1987. Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. *Theoretical and Applied Genetics* 73: 744–750.

- Osuji, J; Harrison, G; Crouch, J; Hesslop-Harrison, JS. 1997. Identification of genomic constitution of *Musa* L. lines (bananas, plantains and hybrids) using molecular cytogenetics. *Annals of Botany* 80: 787–793.
- Palombi, MA; Damiano, C. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Reports* 20: 1061–1066.
- Patzak, J. 2003. Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. *Euphytica* 131: 343–350.
- Peerbolte, R; Ruijgrok, P; Wullems, G; Schilperoort, R. 1987. T-DNA rearrangements due to tissue culture: somaclonal variation in crown gall tissues. *Plant Molecular Biology* 9: 51–57.
- Peteira, B; Finalet, JA; Fernández, E; Sánchez, I; Miranda, I. 2003. Caracterización de la variabilidad genética en *Musa* spp. con la utilización de marcadores RAPD. *Revista de Protección Vegetal* 18: 112–118.
- Picca, A; Helguera, M; Salomón, N; Carrera, A. 2004. Marcadores moleculares. In Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. eds. *Biotechnology y mejoramiento vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biología. Argentina, Ediciones INTA. p. 61-68.
- Pierik, RLM. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Kluwer. 364 p.
- Polanco, C; Ruiz, ML. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science* 162: 817–824.
- Prado, MJ; Gonzalez, MV; Romo, S; Herrera, MT. 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 1–10.
- Puente, R. de la; González, AI; Polanco, C; Ruiz, ML. 2004. Análisis a nivel de la secuencia de marcadores AFLPs indicadores de variación somaclonal en el centeno. *In Congreso de Mejora Genética de Plantas* (21 – 24 setiembre, 2004, España). León, España. Universidad de León. *Actas de Horticultura* 41: 29-32.
- Qin, Y; Li, H-L.; Guo, Y-D. 2007. High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. *Scientia Horticulturae* 111: 203–208.
- Rahman, MH; Rajora, OP. 2001. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Genetics and Genomics* 20: 531–536.
- Raimondi, JP; Masuelli, RW; Camadro, EL. 2001. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD finger printing and cytogenetics analysis. *Scientia Horticulturae* 90: 19–29.
- Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 1111–1120.
- Ramage, CM; Borda, AM; Hamill, SD; Smith, MK. 2004. A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas (*Musa* spp. AAA). *Scientia Horticulturae* 103:145–151
- Renau-Morata, B; Nebauer, SG; Arrillaga, I; Segura, J. 2005. Assessments of somaclonal variation in micropropagated shoots of *Cedrus*: consequences of axillary bud breaking. *Tree Genetics and Genomes* 1: 3–10.
- Rode, A; Hartmann, C; Dron, M; Picard, E; Ouetier, F. 1985. Organelle genome stability in anther-derived double haploids of wheat (*Triticum aestivum* L., cv. 'Moison'). *Theoretical and Applied Genetics* 71: 320–324.
- Rode, A; Hartmann, C; Benslimane, A; Picard, E.; Ouetier, F. 1987. Gametoclonal variation detected in the nuclear ribosomal DNA from double haploid lines of a spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. 'César'). *Theoretical and Applied Genetics* 74: 31–37.
- Roth, EJ; Frazier, BL; Apuya, NR; Lark, KG. 1989. Genetic variation in an inbred plant: variation in tissue cultures

- of soybean (*Glycine max* L., Merrill). *Genetics* 121: 359–368.
- Sabir, A; Newbury, HJ; Todd, G; Catty, J; Ford-Lloyd, BV. 1992. Determination of genetic stability using isozymes and RFLPs in beet plants regenerated *in vitro*. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 113–117.
- Sahijram, L; Soneyi, JR; Bollamma, KT. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 39: 551–556.
- Sánchez-Teyer, LF; Quiróz-Figueroa, F; Loyola-Vargas, V; Infante, D. 2003. Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology* 23: 107–115.
- Schmitt, F; Oakeley, EJ; Jost, JP. 1997. Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. *Journal of Biological Chemistry* 272: 1534–1540.
- Seo, BB; Do, GS; Devi, J. 2004. Chromosomal and molecular analysis of somaclonal variation in certain *Allium* species. *In: Mujib, A; Myeong-je, C; Predieri, S; Banerjee, S.* eds. *In vitro* application in crop improvement. Enfield, EUA, Science Publishers. p. 79-102.
- Smulders, MJM. 2005. Are there adequate methods for assessing somaclonal variation in tissue culture propagated plants? *In: Libiaková, G; Gaidosová, A.* eds. Final conference / Cost 843 and Cost 851 (June 28 – July 3, 2005, Slovakia). p. 201-203.
- Solomon-Blackburn, R; Barker, H. 2001. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 86: 17–35.
- Speeckaert, F; Jacobs, M. 1988. Study of the divergence of moderately repetitive sequences in *Nicotiana* species and in protoclonal lines of *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 746–750.
- Tregear, JW; Morcillo, F; Richaud, F; Berger, A; Singh, R; Cheah, SC; Hartmann, C; Rival, A; Duval, Y. 2002. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *Journal of Experimental Botany* 53: 1381–1396.
- Tremblay, L; Levasseur, C; Tremblay, FM. 1999. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany* 86: 1373-1381.
- Tyagi, R; Agrawal, A; Mahalakshmi, C; Hussain, Z; Tyagi, H. 2007. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43: 51–58.
- Venkatachalam, L; Sreedhar, RV; Bhagyalakshmi, N. 2007. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. *Plant Growth Regulation* 51:193-205.
- Vidal, MC; García, M. 2000. Analysis of *Musa* spp. somaclonal variant resistant to Yellow Sigatoka. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 23-31.
- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van De Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Williams, JGK; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Withers, LA; Wheelands, SK; Williams, JT. 1990. *In vitro* conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. *Euphytica* 45: 9–22.

