

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

USO DE MARCADORES MOLECULARES EN PLANTAS; APLICACIONES EN FRUTALES DEL TRÓPICO¹

Álvaro Azofeifa-Delgado²

RESUMEN

Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. En el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica sobre el uso de marcadores moleculares en plantas, con énfasis en el uso de los mismos en especies frutales del trópico. Comprende aspectos relativos al uso e importancia, ventajas, desventajas y características, evolución de las principales metodologías de marcaje a través del tiempo y una explicación de las técnicas de uso más frecuente. Por último, se presenta una lista de las publicaciones más relevantes hasta el año 2005. En ésta se indican los autores, la especie estudiada, el objetivo del trabajo, la técnica empleada así como los principales resultados obtenidos.

Palabras clave: Marcadores moleculares, frutales tropicales, ADN, análisis genéticos, variación genética.

ABSTRACT

Use of molecular markers in plants; application on tropical fruit trees. In the present work, a literature review was conducted on the use of molecular markers in plants, with emphasis on their use in tropical fruit species. Aspects related to the use and importance, as well as to the advantages, disadvantages and characteristics of different markers are included. Moreover, the historical development of the main methodologies along time and an explanation of the techniques most frequently used are also considered. Finally, a list of the most relevant publications until year 2005 is included. This comprises information about authors, genotypes, the objective of the work, the techniques used, and the main results obtained.

Key words: Molecular markers, tropical fruits, DNA, genetic analysis, genetic variation.



INTRODUCCIÓN

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley 1983). En primer orden, la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Rallo *et al.* 2002). No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos; por ejemplo la presencia o ausencia de espinas en los cítricos. Con frecuencia estos marcadores solo es

posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto. Para la gran mayoría de frutales tropicales esto significa una espera, no deseable, de varios años. Además, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Powell 1992; Phillips *et al.* 1995). Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales.

¹ Recibido: 8 de febrero, 2006. Aceptado: 18 de julio, 2006.

² CIGRAS. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. 5060 San Pedro de Montes de OCA. Correo electrónico: aaazofei@cariari.ucr.ac.cr

Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Tanksley 1983; Powell 1992; Phillips *et al.* 1995; Rallo *et al.* 2002).

Dentro de los marcadores moleculares se menciona la existencia de dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN.

DEFINICIÓN

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia notípica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (SIDTA 1999). Para Valadez y Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para algún antibiótico).

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards 1998).

Algunos ejemplos de ellos son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias

simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO) etc. (Rallo *et al.* 2002).

TIPOS DE MARCADORES

Isoenzimas

Las isoenzimas, o aloenzimas, son las proteínas más ampliamente usadas como marcadores moleculares y éstas fueron los primeros marcadores moleculares usados en genética de plantas (Tanksley *et al.* 1981). Las isoenzimas son variantes de una misma enzima (son formas funcionalmente similares de enzimas), que comparten un sustrato en común pero difieren en su movilidad electroforética. Incluyen todos los polímeros de subunidades producidos por diferentes loci o por alelos diferentes en el mismo locus. Diferentes individuos en una misma población pueden tener diferentes formas moleculares de la misma proteína. Esa variabilidad en cuanto a la estructura de las proteínas es producida por factores genéticos o epigenéticos.

Su análisis se realiza extrayendo la enzima de los tejidos de la planta, tras lo cual, las variantes son separadas con electroforesis y visualizadas mediante la tinción del gel con colorantes específicos (Powell 1992; Haines 1994). Entre las variantes enzimáticas frecuentemente empleadas se mencionan; malato deshidrogenasa, fosfoglucomatasa, glutamato oxaloacetato transaminasa, shikimato deshidrogenasa y peroxidasa (Jarret y Litz 1986). No obstante, Tanksley (1993) menciona que el uso de las isoenzimas ha estado muy limitado por el escaso número de colorantes enzimáticos disponibles y por la imposibilidad de contar con suficientes marcadores para cubrir todo un genoma.

Forrest (1994) menciona que las isoenzimas han probado ser de gran valor en estudios de mejoramiento tanto en poblaciones naturales como en plantaciones de árboles y mantienen cierto valor de utilidad, especialmente en estudios a gran escala de estructura poblacional y en relación con la resistencia a plagas y enfermedades. Por ejemplo, González-Pérez *et al.* (2004) realizaron un estudio sobre la estructura poblacional de las palmeras *Phoenix canariensis* y *P. dactylifera* en Islas Canarias, España. También, Jarret y Litz (1986) utilizaron los sistemas isoenzimáticos como

marcadores para discriminar entre varios clones de bananos y plátanos.

Marcadores de ADN

Otro grupo de marcadores son los marcadores de ADN. Según Karp *et al.* (1997) dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas. Categoría 1: métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs). Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores (“primer”) arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), RAPD, RAMPO. Categoría 3: PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, SSR, Inter secuencias simples repetidas (ISSR). Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la PCR.

Según se observó en la revisión bibliográfica, los investigadores han utilizado mayoritariamente unos pocos tipos de marcadores para los estudios desarrollados en especies frutales del trópico. A continuación se presentan una breve referencia de cada uno, así como ejemplos de los mismos.

I- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El análisis RFLP es una técnica usada en los programas de investigación desde los años 1970. Inicialmente fue empleada para el mapeo físico de los adenovirus (Grodzicker *et al.* 1974) y en la construcción de un mapa genético de ligamiento para humanos (Botstein *et al.* 1980). Paterson (1996) menciona que a partir de ambas publicaciones, especialmente la de Botstein *et al.* (1980), se presentan los principios básicos que sustentan el uso de “Marcadores Moleculares” y que representan el fundamento de los posteriores análisis genético - molecular en plantas y animales. Valadez y Kahl (2000) definen los RFLPs como la variación en la longitud de los fragmentos de ADN producida por una endonucleasa de restricción específica a partir de ADNs genómicos de dos o más individuos de una especie. Los RFLPs se generan por rearrreglos o mutaciones que dan lugar a la creación o delección de sitios de reconocimiento para las endonucleasas específicas. Estas variaciones también pueden deberse a la presencia de ADN repetido con diferente cantidad de copias sobre una región cromosómica específica (por

ejemplo, número variable de repeticiones en serie). El concepto principal fue que la mutación en el sitio de restricción, o la mutación que altera la distancia entre los sitios adyacentes de restricción podría ser visualizada como “Marcadores de ADN”.

Para realizar el análisis se necesitan las “enzimas de restricción”. Paterson (1996) menciona que éstas actúan como “tijeras moleculares” altamente específicas. Estas enzimas reconocen y cortan el ADN en sitios específicos. La alta especificidad para reconocer secuencias es la base para la mayoría de estrategias de clonaje del ADN. La gran mayoría de las enzimas de restricción utilizadas en el clonaje molecular reconocen secuencias de cuatro, cinco ó seis nucleótidos de longitud.

Después de la publicación de Botstein *et al.* en 1980 los RFLPs han sido ampliamente usados en plantas con diferentes objetivos: caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos, pureza de semillas híbridas, selección y/o localización de genes específicos (mediante análisis de ligamiento) de características agronómicas importantes, etc. (Phillips *et al.* 1995; Valadez y Kahl 2000).

Los marcadores RFLP se comportan como marcadores codominantes, en tanto que los marcadores morfológicos y los marcadores basados en PCR, poseen alelos que interactúan de manera dominante/recesiva. Además, el nivel de variación alélica de los marcadores RFLP en poblaciones naturales de plantas es mayor que con los marcadores morfológicos (Helentjaris *et al.* 1985).

Los pasos generales para el análisis RFLP son los siguientes: Paso 1. Aislamiento del ADN. 2. El ADN se digiere con endonucleasas de restricción, que cortan el ADN en puntos que poseen una secuencia particular de reconocimiento. 3. Los fragmentos son separados con base en su tamaño usando electroforesis en gel de agarosa. 4. Luego se aplica la técnica denominada “Southern Transfer” (Transferencia de ADN), la cual involucra la transferencia del patrón de fragmentos de electroforesis, a un soporte sólido y manipulable, por ejemplo a una membrana de “nylon”. 5. Luego de la transferencia, la membrana se expone a una sonda marcada, que posee una secuencia homóloga a uno o más fragmentos o a parte de estos, de tal manera que se produce la hibridación del ADN. 6 y 7. La técnica general para producir la sonda marcada se conoce como “Nick Translation” y se basa en la remoción en la

sonda, de pequeños grupos de nucleótidos (aproximadamente 10) con una exonucleasa. Mediante la acción de la enzima ADN polimerasa I, la cadena se resintetiza a través de la reincorporación de nucleótidos marcados radioactivamente o por medio de otras técnicas. 8. La detección de las bandas de hibridación se realiza por luminiscencia (Phillips *et al.* 1995).

Uno de los pasos del análisis RFLP incluye un procedimiento de electroforesis. En general, la electroforesis es una técnica comúnmente empleada para la separación, identificación y purificación de moléculas de ácidos nucleicos. Se basa en el hecho de que las moléculas de los ácidos nucleicos están cargadas negativamente y migran hacia el ánodo en un campo eléctrico. La electroforesis del ADN usualmente se realiza en una matriz de agarosa o poliacrilamida, inmersa en un buffer salino que permita el establecimiento de un campo eléctrico (Paterson 1996).

Según Paterson (1996) el costo, la complejidad técnica y la gran cantidad de ADN que se requiere pueden ser limitantes para el empleo de los RFLP como técnica de diagnóstico. Bernatzky (1988) menciona como otra limitante, que en algunos casos, aunque la variación interespecífica es alta, los individuos de una población o los cultivares de una especie muestran una variación baja, lo cual reduce las posibilidades de encontrar polimorfismos útiles. Aunque esto puede ser solucionado usando enzimas que corten el ADN más frecuentemente, o simplemente, evaluando una mayor variedad de enzimas.

Para Paterson (1996), las limitaciones de los marcadores RFLP mencionadas condujeron a la implementación de nuevas técnicas moleculares. Este mismo autor menciona, que en el caso de las plantas, para cierto tipo de análisis, los RFLP continúan teniendo relativa importancia como técnica molecular.

II- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis PCR es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores de 6 Kb en promedio (Valadez y Kahl 2000). Usa, según la técnica,

uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Erich 1989; Valadez y Kahl 2000).

Mayores detalles sobre esta técnica se pueden encontrar en Valadez y Kahl (2000).

El análisis PCR, desde su invención, por Saiki *et al.* (1985), ha sufrido modificaciones y en algunos casos ha generado incluso nuevas técnicas (Phillips *et al.* 1995). Rallo *et al.* (2002) mencionan que la gran mayoría de los marcadores moleculares del ADN, de uso actual, se basan en la técnica del PCR.

La técnica PCR ha suministrado un conjunto de marcadores como por ejemplo; los RAPDs, SSR, AFLPs, regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCARs), amplificación selectiva de loci polimórficos (SAMPLs), amplificación azarosa de las huellas del ADN "ADN Fingerprinting" (RAF) y amplificación directa con ADN microsátélites (DAMD) (SIDTA 1999; Ramage *et al.* 2004; Saxena *et al.* 2005).

La ADN polimerasa ADN dependiente es una enzima que, en unas condiciones determinadas y en presencia de una pequeña cadena de ADN, que actúa como cebador, es capaz de producir millones de copias de determinados fragmentos del ADN. Estos fragmentos se separan posteriormente por peso molecular y conformación mediante técnicas electroforéticas, obteniéndose un patrón de bandas específico que nos permite diferenciar individuos (Rallo *et al.* 2002).

III- Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

Este análisis fue descrito por primera vez en 1990 por dos grupos de investigadores independientes

Williams *et al.* (1990) y Welsh y McClelland (1990). Phillips *et al.* (1995) mencionan que en esencia es la misma metodología PCR, por lo que a veces se le refiere con este nombre.

La modificación que les dio origen consistió en sustituir en la tecnología PCR, el uso de un par de iniciadores cuidadosamente diseñados y un poco largos, por un solo iniciador corto, de alrededor de 10 nucleótidos de longitud y de secuencia arbitraria, con la capacidad de unirse a regiones específicas en el genoma (Waugh y Powell 1992; Valadez y Kahl 2000). En el análisis PCR los dos iniciadores son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y en el análisis RAPD, el iniciador se usa para amplificar secuencias al azar de un patrón complejo de ADN (Phillips *et al.* 1995).

Los polimorfismos producidos con la técnica RAPD se denominan marcadores RAPD, y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Como regla general, el tamaño de las variantes se detecta muy escasamente y los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus. En los estudios de herencia, los productos de amplificación se comportan como marcadores dominantes (Waugh y Powell 1992).

Los RAPDs generan un número inmenso de marcadores y, al contrario de los RFLPs, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor (Phillips *et al.* 1995).

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos: 1). ADN molde: ADN proveniente de la muestra a analizar. 2). El iniciador: que es un oligonucleótido, con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Debe tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente. 3). Desoxirribonucleótidos: se requiere de concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena. 4). Solución buffer. 5). Taq-polimerasa: es una enzima ADN-polimerasa ADN dependiente termoestable. Tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde a partir de un punto

determinado, fijado en este caso, por el iniciador (Phillips *et al.* 1995).

Durante el análisis RAPD se dan una serie de reacciones químicas en forma cíclica de manera similar a lo que ocurre en una reacción PCR pero contemplando la modificación mencionada anteriormente.

La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por varios factores, entre ellos: El número de ciclos de amplificación, la cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el iniciador y la temperatura (Phillips *et al.* 1995).

IV- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

Los AFLPs son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles. Sin embargo, la técnica es más complicada de ejecutar que la de los RAPD y el SSR, además requieren una mayor cantidad de ADN (Karp *et al.* 1997; SIDTA 1999). Se pueden emplear, por ejemplo, en la construcción del armazón de los mapas genéticos en el que se localizan los marcadores codominantes, para discriminar entre individuos cercanamente relacionados y para localizar genes específicos en genomas complejos (Valadez y Kahl 2000).

El análisis AFLP combina la digestión con enzimas de restricción con el PCR. El primer paso involucra la digestión del ADN con dos enzimas específicas de restricción, una de las cuales corta secuencias precisas y la otra corta más frecuentemente. Es necesario agregar adaptadores para que éstos se peguen en los bordes de los fragmentos recién formados y de esta manera proveer una secuencia conocida para poder amplificar mediante PCR. En este paso, también se requiere el uso de ligasas para facilitar la unión entre los bordes de los fragmentos y las secuencias cortas conocidas. El uso de adaptadores es necesario porque las secuencias que quedan en los bordes de los fragmentos, luego de ser cortados, no son adecuadas para actuar como iniciadores (Karp *et al.* 1997).

Si el primer paso se realizó adecuadamente, todos los fragmentos de restricción se amplificarían mediante

PCR. Para poder discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman, se diseñan los iniciadores de tal manera que incorporen el adaptador de secuencia conocida más uno, dos o tres pares de bases (dejando por fuera alguna de las cuatro posibles: A, G, C o T). La amplificación mediante PCR solo ocurrirá en aquellos fragmentos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para los pares de base adicionales. En este caso, los pares de bases adicionales actúan como nucleótidos selectivos. Si solamente se utiliza uno de estos nucleótidos se amplificarán más fragmentos de los que se podrían amplificar si se utilizaran dos nucleótidos. Del mismo modo, si se utilizan tres nucleótidos se obtendrían menos fragmentos amplificados. Por alguna razón técnica, la adición de más de tres nucleótidos selectivos al iniciador resulta en una amplificación PCR no específica (Karp *et al.* 1997).

Durante el PCR normalmente se realizan dos ciclos térmicos selectivos. En el primero se utiliza un único nucleótido selectivo, en el segundo ciclo térmico, se utiliza el anterior nucleótido más uno o dos nucleótidos selectivos adicionales. Los fragmentos amplificados de esta forma pueden ser luego separados en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis y los productos de la amplificación pueden ser visualizados mediante fluorescencia (Karp *et al.* 1997).

Mayores detalles sobre la técnica se pueden encontrar en Valadez y Kahl (2000).

Valadez y Kahl (2000) mencionan que los AFLPs surgen a partir de: A) Polimorfismos en los sitios de restricción, en donde una secuencia específica para el reconocimiento de una endonucleasa de restricción, está presente o ausente. B) Polimorfismos en la longitud de la secuencia, donde el número de las secuencias repetidas arregladas en serie ("tandem") tienen sitios variables. C) Cambios en los pares de bases de ADN no asociados con sitios de restricción.

V- Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR; MP-PCR)

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por

todo el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.* 1995; Valadez y Kahl 2000).

Los tipos de repeticiones que ocurren en los SSR varían entre las especies. Las repeticiones más frecuentes en las plantas son (AA)_n y (AT)_n (Lagercrantz *et al.* 1993). Estas repeticiones están concentradas en secciones grandes del ADN que no codifican para genes conocidos y que se han llamado macrosatélites, por lo que probablemente no son útiles como aquellos marcadores que están distribuidos al azar (Phillips *et al.* 1995). Por el contrario, Wu y Tanksley (1993) encontraron que las secuencias (GA)_n y (GT)_n y sus complementos (CT)_n y (CA)_n se presentan con más frecuencia y están aleatoriamente espaciadas en el genoma de maíz. También observaron que estos loci son altamente polimórficos entre variedades de arroz, por lo que son útiles como herramientas de mapeo y para estudios de polimorfismos intraespecíficos. Los SSRs representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para los estudios de mapeo y para la determinación de polimorfismos (Phillips *et al.* 1995).

El desarrollo de marcadores SSR es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite), aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo. Al respecto, Cervera *et al.* (2002) mencionan que aunque los microsatélites permiten analizar sólo un locus por experimento son bastante informativos ya que dejan diferenciar las variantes alélicas de los loci analizados y por lo tanto identificar grupos de ligamiento entre diferentes mapas genéticos. Sin embargo, para su desarrollo se precisa conocer la secuencia y, por lo tanto, son menos numerosos que otros marcadores dominantes.

Estos marcadores son ideales para el estudio de ligamiento genético en plantas y el mapeo físico, los

estudios poblacionales y la identificación de variedades (SIDTA 1999).

La tecnología para el análisis de microsatélites es similar a la utilizada para el análisis RAPD, con la adición de una evaluación y secuenciación previa para determinar los iniciadores. La detección del polimorfismo SSR se realiza mediante un PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de secuenciación. Las variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe *et al.* 2004).

Una técnica derivada de la anterior se conoce como "PCR iniciada con microsatélites anclados (AMP-PCR)" la cual emplea iniciadores con "anclas" en sus extremos 3' o 5'. Esta clase de iniciadores consiste de una, dos o tres bases adicionales al microsatélite, por ejemplo; C(CT)₈, CA(CT)₈, CAC(CT)₈ o (CT)₈C, (CT)₈CA y (CT)₈CAC, y sirven para seleccionar aquellas islas de microsatélites en el genoma que están flanqueados con el complemento de bases específicas, por ejemplo; T(TA)₈, GT(GA)₈, GTG(GA)₈ o (GA)₈G, (GA)₈GT y (GA)₈GTG, por lo que se incrementa su especificidad (Valadez y Kahl 2000). Generalmente esta técnica es más eficiente que las técnicas SSR o RAPDs, ya que ha demostrado detectar más variabilidad genética (Salimath *et al.* 1996).

En el Cuadro 1, se presenta un resumen con las principales características de los marcadores mencionados.

EJEMPLOS Y USOS

A continuación se presenta una serie de ejemplos generales del uso de marcadores moleculares en

especies vegetales. Posteriormente se ofrece una revisión sobre el uso de los mismos en especies frutales del trópico.

Los marcadores moleculares han sido usados con varios fines. En el Cuadro 2 se presentan ejemplos reportados en la literatura sobre el uso de los mismos en especies frutales del trópico. Como se aprecia, los usos más frecuentes corresponden a la estimación de la diversidad genética intra e inter poblacional, sea en especies cultivadas o silvestres, en el desarrollo de mapas de ligamiento, para estudio de las relaciones filogenéticas entre especies, también como herramienta para determinar la mejor estrategia de conservación de recursos genéticos por ejemplo en la formación de colecciones nucleares, en la identificación de duplicados, entre otros. En relación, Sánchez (2002) menciona que los marcadores moleculares son la principal herramienta utilizada hoy en día en microorganismos, plantas y animales para: caracterización de germoplasma, identificación de genotipos, determinación de pureza, análisis de diversidad genética, mejoramiento genético asistido por marcadores, aislamiento y caracterización de genes específicos para usar en transformación genética, construcción de mapas de ligamiento, en la identificación de transformantes individuales o su progenie, entre otros.

Ejemplo de isoenzimas

Harris *et al.* (1994), evaluaron la variabilidad genética de *Leucaena leucocephala* (Lam.) en 24 poblaciones de diferentes países, mediante un análisis de isoenzimas. Con la utilización de tres sistemas de isoenzimas (aspartato aminotransferasa, peroxidasa y glucosa-6-phosphato isomerasa) se pudo identificar

Cuadro 1. Resumen de las principales características de los marcadores: Isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP y SSR.

Característica	Isoenzimas	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
Nivel de polimorfismo que detecta	Bajo	Medio	Medio	Medio	Alto
Dominancia	Usualmente codominante	Codominante	Dominante	Codominante / dominante	Codominante
Número de loci	Multiloci	Multiloci	Multiloci	Multiloci	Multiloci
Abundancia en el genoma	Baja	Media	Muy alta	Alta	Media
Número de citas*	7	18	33	13	21

* Se refiere al número de veces citado en el Cuadro 2.

Tomado de Lowe *et al.* (2004); Becerra y Paredes (2000).

Cuadro 2. Especies frutales del trópico mostrando ejemplos de la utilidad y aplicaciones de los marcadores moleculares.

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Albany <i>et al.</i> (1998)	<i>Psidium</i> spp.	Determinar la aplicabilidad del análisis de conglomerado para complementar el estudio de patrones electroforético.	Isoenzimas	El análisis de conglomerado complementó el estudio de zimograma y permitió diferenciar entre las especies <i>P. guajava</i> y <i>P. friedrichsthalianum</i> .
Aradhy <i>et al.</i> (1999)	Género Caricaceae	Análisis de las relaciones filogenéticas	RFLP	Se confirmó la estrecha relación entre las especies silvestres de Sur América. Se pudo dilucidar dos linajes evolutivos básicos en el género; uno definido por la <i>C. papaya</i> cultivada y el otro por las especies silvestres de Sur América.
Archak <i>et al.</i> (2003)	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Comparar tres tipos de marcadores en banco de germoplasma.	RAPD, ISSR, AFLP	Se estudió la eficiencia y utilidad de las tres técnicas en la detección de variaciones entre plantas. Todas las técnicas pudieron discriminar entre los distintos materiales. Pero, los AFLP exhiben el mayor poder de discriminación, por lo que es recomendado para realizar los análisis genéticos.
Ashworth y Clegg (2003)	<i>Persea americana</i> L.	Análisis de las relaciones genéticas entre materiales.	SSR, RFLP	Los marcadores permitieron la separación de los materiales en tres grupos que corresponden a las razas mexicana, guatemalteca y antillana. Se encontró una considerable diversidad entre los materiales procedentes de Guatemala. El análisis de la población con marcadores SSR detectó un mayor nivel de heterocigosis respecto del resultado de los RFLP.
Aukar <i>et al.</i> (2002)	<i>Pasiflora</i> spp.	Evaluación de la variabilidad genética.	RAPD	Estimaron tasas de similaridad entre las diferentes especie. Dentro de <i>P. edulis</i> detectaron una alta variabilidad genética.
Billotte <i>et al.</i> (2004)	<i>Bactris gasipaes</i> Kunth.	Identificar secuencias marcadoras.	SSR	Se determinaron 18 secuencias marcadoras. Las cuales se pueden utilizar en especies del género <i>Bactris</i> así como de los géneros <i>Astrocaryum</i> y <i>Elaeis</i> .
Billotte <i>et al.</i> (2005)	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	Desarrollo de mapa de ligamiento.	SSR, AFLP	Desarrollo de mapa de ligamiento de alta densidad. Los 944 marcadores empleados se distribuyen en 16 grupos de ligamiento independientes entre sí. Cada grupo encaja en uno de los pares de cromosomas homólogos de la especie.
Birnbaum <i>et al.</i> (2003)	<i>Persea americana</i> L.	Evaluar herramientas que permitan medir la diversidad genética en plantaciones a través de los años.	SSR	Los resultados apoyan la factibilidad de la conservación en la plantación. No obstante, la simulación de datos sugiere que puede ocurrir un fuerte flujo de genes, que puede conllevar a una pérdida de diversidad genética.
Brown <i>et al.</i> (2003)	<i>Annona muricata</i> L.	Determinar variabilidad genética entre materiales.	RAPD	Identificaron 14 fragmentos RAPD polimórficos. Con el empleo de los mismos determinaron una alta variabilidad genética. Además, identificaron dos grupos de materiales: los de origen Venezolano y los de Brasil.
Cardeña <i>et al.</i> (1998)	<i>Cocos nucifera</i> L.	Identificar marcadores adecuados para el mejoramiento de la especie.	Isoenzimas	Se discute la aplicación de los marcadores en los programas de mejoramiento y estudios filogenéticos.
Cardoso <i>et al.</i> (2000)	<i>Euterpe edulis</i> Mart.	Análisis de la diversidad genética.	AFLP	La estructura genética poblacional se estudió realizando un análisis de variancia molecular (AMOVA) a la información generada de 429 marcadores. El resultado revela una moderada variación genética dentro de las poblaciones, y que la diferenciación genética entre poblaciones correlaciona positivamente con la distancia geográfica.

Continúa...

Continuación Cuadro 2...

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Carreel <i>et al.</i> (2002)	<i>Musa</i> spp.	Determinación del linaje de plantas.	RFLP	Los resultados permiten entender mejor las relaciones en y entre las accesiones, así como los orígenes del complejo <i>Musa</i> . También sugieren que el primer centro de domesticación fue en Filipinas, en el área de Nueva Guinea.
Clement <i>et al.</i> (2002)	<i>Bactris gasipaes</i> .	Análisis genético entre materiales.	AFLP	Establecieron las relaciones filogenéticas entre materiales. En donde determinaron dos grupos principales, cada grupo subdividido en dos subgrupos.
Crouch <i>et al.</i> (2000a)	<i>Musa</i> spp.	Análisis de diversidad genética. Comparación de la clasificación tradicional respecto de la mediada por marcadores RAPDs.	RAPD	Determinaron una buena correlación ($R^2=0,78$) entre los estimados de diversidad genética basados en 76 y 164 bandas RAPDs, pero la correlación fue pobre entre estos y los índices fenotípicos basados en caracteres agronómicos. Estos resultados sugieren que la clasificación tradicional, basada en los morfotipos, no corresponde a la diversidad genética existente.
Crouzillat <i>et al.</i> (2000a)	<i>Theobroma cacao</i> L.	Determinar los componentes genéticos que controlan la producción en la F1 de cruces entre clones de Catongo y Pound 12.	RFLP, RAPD y AFLP	Los marcadores solos o en combinación con los fenotipos permitieron una selección temprana de los árboles más productivos. Desarrollo de mapas genéticos.
Crouzillat <i>et al.</i> (2000b).	<i>Theobroma cacao</i> L.	Posible uso de marcadores relacionados a resistencia de enfermedades.	RFLP, RAPD y AFLP	Desarrollo de mapa genético.
Decker-Walters <i>et al.</i> (2002)	<i>Cucumis melo</i>	Definir origen y afinidad de los materiales silvestres en Norte América.	RAPD, SSR	El análisis con marcadores RAPDs y SSRs, así como el uso de caracteres morfológicos y fisiológicos permitió entender mejor las relaciones en y entre las accesiones. Los datos sugieren que las poblaciones de Norte América son distintas, y pueden ser clasificadas como una especie diferente.
Dias <i>et al.</i> (2003)	<i>Theobroma cacao</i> L.	Determinar la distancia genética entre materiales.	RAPD	Utilizaron 130 marcadores RAPD y datos de producción. Los autores sugieren que con ambos elementos se pueden elegir los mejores individuos para realizar los cruces.
Dillon <i>et al.</i> (2005)	<i>Vasconcellea</i> spp.	Desarrollo mapa de ligamiento que comprenda características ligadas a la resistencia del virus PRSV-P.	RAF	Desarrollo de mapas de ligamiento discretos para ambas especies los cuales son útiles para futuros estudios de las características de resistencia identificadas.
Duval <i>et al.</i> (2001)	<i>Ananas</i> y <i>Pseudananas</i>	Análisis de la diversidad genética.	RFLP	Determinaron que el mayor polimorfismo ocurre a nivel intraespecífico, especialmente en <i>A. ananassoides</i> y en <i>A. paraguayensis</i> . <i>A. comosus</i> se presenta relativamente homogénea. A pesar de la creencia, los resultados no muestran la existencia de barreras reproductivas entre los materiales, más bien, indican la existencia de un flujo génico, realzando el papel efectivo de la reproducción sexual en un género que predominantemente.
Fauré <i>et al.</i> (1993)	<i>Musa</i> spp.	Construcción mapa de ligamiento.	RFLP, RAPD, Isoenzimas	Desarrollo parcial del mapa. Se detectaron un total de 90 loci, de los cuales 77 se colocaron en 15 grupos de ligamiento y 13 segregaron independientemente.
Feuser <i>et al.</i> (2003)	<i>Ananas comosus</i>	Detección de variantes en plantas cultivadas <i>in vitro</i> , ya sea, en un sistema de inmersión temporal o en uno estacionario.	Isoenzimas, RAPD	Ninguno de los dos marcadores, por sí solo, detectó diferencias significativas entre las plantas propagadas en los dos sistemas de cultivo. Pero cuando se combinó el uso de marcadores se detectaron más variantes en el sistema estacionario. En todos los casos los RAPDs revelaron más variantes que las isoenzimas.

Continúa...

Continuación Cuadro 2...

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Fiedler <i>et al.</i> (1998)	<i>Persea americana</i> Mill.	Determinar las relaciones filogenéticas	RAPD	Determinaron marcadores potenciales específicos para cada una de las razas. Desarrollaron un dendrograma que muestran las relaciones filogenéticas.
Ge <i>et al.</i> (2005)	<i>Musa spp.</i>	Análisis de la estructura poblacional.	SSR, RFLP	Determinaron las relaciones genéticas entre los materiales.
Gonzalo <i>et al.</i> (2005)	<i>Cucumis melo L.</i>	Construcción de mapa.	SSR, RFLP	Construcción de mapa con una longitud de 1.021cM. Distribuido en 12 grupos de ligamiento y una densidad de 3,11 cM/marcador. Los marcadores SSR cubren aproximadamente el 80 % de la longitud total del mapa.
Graham y McNicol (1995)	<i>Rubus spp.</i>	Medir la habilidad del marcador para determinar las relaciones genéticas.	RAPD	La técnica fue muy útil para discriminar entre los materiales. Todos los marcadores estudiados son idóneos, pues son polimórficos y detectan diferencias en los materiales emparentados como en los no emparentados.
Grosser <i>et al.</i> (1996)	Rutaceas	Confirmación de híbridos allotetraploides formados.	RAPD	Confirmación de híbridos.
Heaton <i>et al.</i> (1999)	<i>Manilkara zapota</i> (L.) P. Royen	Comparar la diversidad morfológica de la genética en cuatro poblaciones.	RAPD	El análisis con los marcadores moleculares no muestra una diferencia genética significativa entre las poblaciones. Lo que puede inferir que no existe un componente genético en la variación morfológica observada (la cual puede deberse más bien a un factor ambiental), o a una falta de correlación entre los loci RAPD y las características adaptativas.
Hemanth <i>et al.</i> (2001)	<i>Mangifera indica</i> L.	Análisis de la diversidad genética en plantación comercial.	RAPD	La técnica permitió la discriminación entre los genotipos estudiados. Se recalca la utilidad de los marcadores empleados para fines de fitomejoramiento y manejo del germoplasma de la plantación.
Honsho <i>et al.</i> (2005)	<i>Mangifera indica</i>	Aislamiento y caracterización de microsatélites	SSR	Aislaron seis microsatélites marcadores de loci con sus respectivos juegos de iniciadores. Los marcadores fueron capaces de discriminar la composición genética de la mayoría de los genotipos en estudio. Los resultados sugieren el potencial de la técnica para la identificación de los cultivares de mango.
Kaemmer <i>et al.</i> (1997)	<i>Musa spp.</i>	Valorar el uso de la tecnología del Polimorfismo de Marcadores de Secuencias Específicas Vecinas a Microsatélites (STMS).	SSR, PCR	Idoneidad de los SSR para estudios de genética en Musáceas.
Kahangi <i>et al.</i> (2002)	<i>Musa spp.</i>	Determinación de plantas "fidel al tipo" cultivadas <i>in vitro</i> .	RAPD	10 de los iniciadores utilizados generaron 69 secuencias marcadoras que permiten la identificación de los materiales.
Kanashiro <i>et al.</i> (1997)	<i>Bertholletia excelsa</i> Humb. & Bonpl. (Nuez del Brasil)	Análisis de la diversidad genética.	RAPD	Determinaron las relaciones filogenéticas entre los materiales. Encontraron mayor variabilidad genética dentro de una población que entre las poblaciones.
Kashkush <i>et al.</i> (2001)	<i>Mangifera indica</i>	Identificación de materiales y desarrollo de mapa de ligamiento genético.	AFLP	Desarrollo de mapa preliminar de ligamiento, definido por 34 marcadores, el cual consta de 13 grupos de ligamiento.
Kato <i>et al.</i> (2005)	<i>Ananas comosus</i>	Análisis de la diversidad genética.	AFLP	Los marcadores revelaron un alto grado de variación genética en la especie. No obstante, la técnica no pudo discriminar entre los principales grupos de la especie; Cayenne, Española y Queen. El uso de marcadores AFLP reveló un mayor grado de diversidad genética respecto de valores informados previamente en estudios realizados con isoenzimas.

Continúa...

Continuación Cuadro 2...

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Krueger y Roose (2003)	<i>Citrus</i> spp.	Desarrollo de técnica y búsqueda de marcadores para caracterizar embriones cigótico y nucleares.	ISSR	Caracterización de materiales, mejoría en el manejo y orden de la colección.
Lanaud <i>et al.</i> (2004)	<i>Theobroma cacao</i> L.	Mapeo genético y caracterización de gen candidato.	PCR	Secuenciación de genes relacionados a la defensa y resistencia contra <i>Phytophthora</i> .
Lebrun <i>et al.</i> (1998)	<i>Cocos nucifera</i> L.	Análisis de la diversidad genética.	RFLP	Determinan el posible centro de origen, y las relaciones filogenéticas de los materiales.
Lee <i>et al.</i> (1996)	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Mansf. Sandía.	Análisis de la diversidad genética.	RAPD	La técnica permitió la discriminación entre los genotipos estudiados.
Lerceteau <i>et al.</i> (1997)	<i>Theobroma cacao</i> L.	Análisis de la diversidad genética.	RFLP	La técnica permitió la discriminación entre los genotipos estudiados.
Levi <i>et al.</i> (2001)	<i>Citrullus lanatus</i> y <i>C. colocynthis</i> .	Análisis de la diversidad genética.	RAPD	Se pudo determinar las relaciones filogenéticas entre los materiales vegetales, los cuales se agruparon en tres conglomerados. Desarrollo de dendrograma.
Lowe <i>et al.</i> (2000)	<i>Irvingia gabonensis</i> , <i>I. wombolu</i>	Determinación de la variación genética	RAPD	Los resultados permitieron comprender mejor el nivel de relación genética entre las dos especie, entre individuos de la misma especie y parte del proceso de domesticación.
Macedo <i>et al.</i> (2002)	<i>Carica papaya</i>	Determinación del sexo en plántulas de tres cultivares comerciales.	RAPD	Determinaron que el marcador BC210438 es capaz de identificar los individuos hermafroditas en todos los cultivares.
Mayes <i>et al.</i> (2000)	<i>Elaeis guineensis</i>	Evaluación de la diversidad genética.	RFLP	Estimación de las distancias genéticas entre los materiales. Uso de marcadores moleculares en programas de mejoramiento.
Mhameed <i>et al.</i> (1997)	<i>Persea americana</i> Mill.	Análisis de la diversidad genética.	Minisatélites, SSR, ADN fingerpring	Se logró identificar las relaciones filogenéticas entre los materiales en estudio. Se observó una alta variación entre los cultivares de la especie y entre diferentes especies del género <i>Persea</i> .
Moore <i>et al.</i> (2002)	<i>Phoenix dactylifera</i>	Determinar la presencia de los hongos <i>Cladosporium cladosporioides</i> y <i>Sporobolomyces roseus</i> .	Amplificación de fragmentos mediante PCR	Determinaron la presencia positiva de ambos hongos en las partes comestibles del fruto.
N°Goran <i>et al.</i> (2000)	<i>Theobroma cacao</i> L.	Análisis de la variabilidad genética.	RFLP	Encontraron una alta diversidad genética. La cual es mayor dentro de las poblaciones que entre las poblaciones. Detectaron una deficiente heterocigosidad en todas las poblaciones. El número de alelos por locus nunca fue superior de cuatro.
Oliver <i>et al.</i> (2001)	<i>Cucumis melo</i> L.	Construcción mapa de ligamiento.	RFLP, AFLP, RAPD, SSR, Isoenzimas	Desarrollo parcial del mapa. De un total de 411 loci, 391 se colocan en 12 grupos de ligamiento y 21 segregaron independientemente. Un 66% de los marcadores fueron codominantes (RFLP, SSR e isoenzimas).
Parasnis <i>et al.</i> (1999)	<i>Carica papaya</i>	Identificación del sexo en plántulas.	SSR	La prueba (GATA)4 mostró ser indicativa según el sexo.
Pillay <i>et al.</i> (2000)	<i>Musa</i> spp.	Identificar marcadores ligados a los genomas A y B.	RAPD	Desarrollaron tres iniciadores para detectar fragmentos específicos del genoma en las dos especies. Los marcadores fueron capaces de aclarar rápidamente la composición genética de todos los genotipos, facilitando la caracterización y manipulación de líneas en programas de mejoramiento.
Prakash <i>et al.</i> (2002)	<i>Psidium</i> spp.	Análisis de la diversidad genética.	RAPD	Se utilizaron un total de ocho iniciadores con los cuales se pudo amplificar 93 fragmentos polimórficos. Los marcadores utilizados indican una diversidad de baja a moderada entre los materiales.

Continúa...

Continuación Cuadro 2...

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Pugh <i>et al.</i> (2004)	<i>Theobroma cacao</i> L.	Desarrollo e integración de nuevos marcadores microsatélites a mapa de ligamiento.	SSR, RFLP, Isoenzimas	Desarrollo de mapa de ligamiento, más detallado, basado en marcadores codominantes. El nuevo mapa consta de 465 marcadores; 268 SSRs, 176 RFLPs, cinco isoenzimas y 16 Rgenes-RFLP dispuestos en 10 grupos de ligamiento que corresponden al número haploide de cromosomas de la especie.
Raboin <i>et al.</i> (2005)	<i>Musa</i> spp.	Investigar origen del banano comercial cultivado.	RFLP	Del análisis sugieren el posible ancestro común, para los cultivares de los subgrupos Cavendish y Gros Michel, que contribuyó a la formación de los cultivares triploides.
Ramage <i>et al.</i> (2004)	<i>Garcinia mangostana</i> L. y <i>Garcinia</i> spp.	Análisis de diversidad genética.	RAF	Aunque se cree que el mangostan se reproduce exclusivamente por apomixis, los resultados muestran una considerable diversidad genética dentro de la especie y entre las especies.
Risterucci <i>et al.</i> (2000)	<i>Theobroma cacao</i> L.	Mejorar mapa de ligamiento.	Isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP y SSR	Desarrollo de mapa de alta densidad. Comprende el uso de 424 marcadores, los cuales se distribuyeron en 10 grupos de ligamiento y cubren 885,4 cM, con un promedio de espaciamiento entre marcadores de 2,1 cM. La máxima distancia observada entre marcadores adyacentes fue de 16,2 cM.
Risterucci <i>et al.</i> (2005)	<i>Psidium guajava</i> L.	Caracterización de microsatélites	SSR	Primer reporte y caracterización de 23 SSR genómicos en la especie. Se indican que son altamente polimórficas.
Ruas <i>et al.</i> (2001)	<i>Ananas</i> y <i>Pseudananas</i> .	Análisis de la diversidad genética.	RAPD	El 89 % de los marcadores empleados fueron polimórficos. El análisis filogenético estima poca diferencia en las accesiones de una misma especie y una moderada variación interespecífica.
Ruiz <i>et al.</i> (2000)	<i>Citrus</i> spp.	Desarrollar metodología alterna a las isoenzimas, para discriminar entre materiales desarrollados a partir de embriones cigóticos de los nucelares.	SSR	En la mayoría de los casos los SSR son más eficientes que las isoenzimas en la identificación del origen sexual o no de los materiales. Además, los SSR detectaron un mayor nivel de polimorfismo respecto del escaso número de enzimas polimórficas detectadas mediante la técnica de isoenzimas para algunas de las poblaciones estudiadas.
Saxena <i>et al.</i> (2005)	<i>Carica papaya</i>	Medición de la diversidad genética de 10 cultivares comerciales.	RAPD, ISSR, DAMD	Todas las técnicas permitieron determinar las relaciones genéticas en el germoplasma. Determinaron que el mejor método para el análisis es con ISSR.
Schnell <i>et al.</i> (2003)	<i>Persea americana</i> Mill.	Determinar variación genética en y entre razas hortícolas de aguacate.	SSR	Identificación de materiales. No determinaron marcadores útiles, asociados a alelos únicos, para separar entre razas. La agrupación hortícola de las razas es congruente con la agrupación generada por los marcadores.
Sharon <i>et al.</i> (1998)	<i>Persea americana</i> Mill.	Detección de probables loci de características cuantitativas.	SSR, RAPD y ADN fingerprint	Encontraron que seis características se asocian con al menos uno de los 90 marcadores evaluados.
Sondur <i>et al.</i> (1996)	<i>Carica papaya</i>	Desarrollo de mapa de ligamiento.	RAPD	Desarrollo de mapa de ligamiento. Detectaron 96 marcadores polimórficos, 62 de los cuales se distribuyen en 11 grupos de ligamiento. El 80% de los marcadores segrega en proporción Mendeliana. Además se logró mapear el locus que determina el sexo en las plantas, a 14 cM de la región flanqueada por los marcadores RAPDs. Los resultados demuestran la utilidad de la técnica para el desarrollo de mapas básicos de ligamiento genético en la especie.

Continúa...

Continuación Cuadro 2...

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Sripaoraya <i>et al.</i> (2001)	<i>Ananas comosus</i> L.	Análisis de las relaciones genéticas.	RAPD	Se determinaron las relaciones filogenéticas entre los materiales. Los resultados indican que la clasificación generada por los marcadores moleculares es muy similar a la clasificación morfológica.
Staub <i>et al.</i> (2000)	<i>Cucumis melo</i> L.	Análisis de la diversidad genética.	SSR	Desarrollo de dendrograma y análisis de las relaciones filogenéticas entre los materiales.
Syed <i>et al.</i> (2005)	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Ensayar el uso de SSAP.	Amplificación Polimórfica de Secuencias Específicas (SSAP)	Aislaron dos secuencias de Repeticiones Terminales Largas (LTR) del genoma y las utilizaron exitosamente para desarrollar los SSAP.
Tenkouano <i>et al.</i> (1999)	<i>Musa</i> spp.	Comparar mediante marcadores del ADN el comportamiento de la descendencia triploide originada de varios cruces entre di y tetraploides.	Polimorfismo en la Longitud de las Secuencias Simples Repetidas (SSRLP)	Permitió determinar la relación genealógica entre los individuos estudiados. Así como, una baja heredabilidad y una herencia no aditiva para varios caracteres en estudio.
Ude <i>et al.</i> (2003)	<i>Musa</i> (Plátanos)	Análisis de la diversidad genética.	AFLP, RAPD	Los AFLP permitieron mayor discriminación de los materiales que los RAPD. Los AFLP son una herramienta poderosa para detectar polimorfismos en los materiales.
Uma <i>et al.</i> (2005)	<i>Musa balbisiana</i>	Determinar centro de origen y diversidad de la especie.	RAPD	Determinan las relaciones filogenéticas. Distinguen dos grupos: las accesiones con origen en India y con origen en las Islas Andaman y Nicobar. Proponen que <i>M. balbisiana</i> se origina en las tierras del NE de India.
Urasaki <i>et al.</i> (2002)	<i>Carica papaya</i>	Determinación del sexo en plántulas.	RAPD	Determinaron un fragmento de 450 bp que existe tanto en plantas masculinas como hermafroditas. A partir de este fragmento desarrollaron un marcador SCAR que sirve para determinar el sexo en las plántulas.
Van Droogenbroeck <i>et al.</i> (2002)	<i>Carica papaya</i> , <i>Vasconcella</i> spp., <i>Jacaratia</i> spp.	Análisis de las relaciones genéticas entre materiales.	AFLP	El poder de resolución de la técnica permitió separar claramente las especies en los tres géneros. Las relaciones filogenéticas determinadas con los marcadores AFLPs corresponden fielmente a la clasificación taxonómica y son consistentes con otros estudios basados en RAPDs, isoenzimas y cpDNA. También, los marcadores AFLPs empleados confirman la reciente separación de <i>Vasconcella</i> como un grupo de <i>Carica</i> para formar un nuevo género.
Van Droogenbroeck <i>et al.</i> (2004)	Género Caricaceae	Análisis de las relaciones genéticas entre materiales.	RFLP	Detectaron un alto nivel de variación interespecífica mediante la comparación de las regiones mtDNA y cpDNA estudiadas. Análisis de las relaciones filogenéticas y desarrollo de un dendrograma.
Viruel y Hormaza (2004)	<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	Identificación de secuencias marcadoras.	SSR	Se determinaron 12 secuencias marcadoras enriquecidas en repeticiones CT. Los microsatélites desarrollados permitieron discriminar adecuadamente los materiales en estudio.
Viruel <i>et al.</i> (2005)	<i>Mangifera indica</i> L.	Identificación de genotipos de mango.	SSR	Los resultados demuestran la utilidad de los SSR en estudios de identificación, variabilidad, conservación y manejo de germoplasma y domesticación.
Zerega <i>et al.</i> (2004)	<i>Artocarpus altilis</i> (Fruta de pan)	Determinar relación con las especies emparentadas; <i>A. camansi</i> y <i>A. mariannensis</i> .	AFLP	Identificaron marcadores específicos para las especies. Determinaron el posible origen del fruta de pan cultivado actualmente.

fenotipos multienzima y de esta manera fue posible identificar dos subespecies de *L. leucocephala*, además de diferenciar las poblaciones.

Hawkins *et al.* (2001) utilizaron el análisis de isoenzimas, RAPD y SSR para construir un mapa de ligamiento para poblaciones F2 y F3 de sandía (*Citrus lanatus*) derivadas a partir del cultivar New Hampshire Midget, que es susceptible a *Fusarium oxysporum*, y el cultivar resistente PI 296341-FR.

Ejemplos de RFLP

Los RFLP han sido utilizados como marcadores de caracteres agronómicos de gran interés en especies de gramíneas y leguminosas, en el estudio de ligamientos e incompatibilidades de polen y estilo en especies como manzano, cerezo y en la identificación de resistencia a enfermedades en cebada, maíz, etc. (SIDTA 1999).

Lashermes *et al.* (1999) utilizaron marcadores RFLP, en combinación con hibridación genómica *in situ*, para investigar el origen de la especie allotetraploide *Coffea arabica* ($2n=44$). Mediante la comparación de los patrones RFLP de especies diploides potencialmente progenitoras de *C. arabica* fueron identificadas las fuentes de los dos genomas combinados en *C. arabica*. La organización del genoma de *C. arabica* fue confirmada mediante hibridación genómica *in situ* usando simultáneamente un marcaje total del ADN genómico de las especies donadoras putativas. El resultado claramente sugiere que *C. arabica* es un anfidiplóide formado por la hibridación entre *C. eugenioides* y *C. canephora*, o por ecotipos relacionados a estas especies. También, los resultados indican poca divergencia entre los dos genomas constitutivos de *C. arabica* respecto a los genomas de sus progenitores, sugiriendo que la formación de *C. arabica* como especie fue relativamente reciente. La precisa localización de África Central como el lugar de formación de la especie se basa en la presente distribución geográfica de las especies actuales de *Coffea*.

Mayes *et al.* (2000) utilizaron marcadores RFLP, para tasar la diversidad genética dentro de 54 palmas aceiteras. Estas palmas representan la mayoría de los padres en los cruces realizados en los programas de mejoramiento. Se obtuvo un total de 157 bandas a partir de las cuales se calculó la distancia genética entre

las palmeras. El análisis molecular corresponde correctamente con el origen y el pedigree esperado. Estos autores resaltan el potencial de los marcadores en programas de mejoramiento, a través del examen de la estructura genética de un grupo de plantas para estimar los cruces que se pueden realizar con mayor o menor éxito. También mencionan, que permite conocer el pool genético de los padres que son cruzados y estimar el de la descendencia. Así como, evaluar la fidelidad genética de la descendencia.

También, N-Goran *et al.* (2000), mediante la utilización de marcadores RFLP, analizaron la estructura genética de 175 genotipos de *Theobroma cacao* L. procedentes de Centro y Sur América. Este análisis les permitió determinar: una alta diversidad genética entre los materiales, que el número de alelos por locus nunca fue mayor de cuatro, que los genotipos de Centro América son distintos a los de Sur América y por último, determinaron que dentro de una población la diversidad de genes es alta.

Por su parte, Alston y Batlle (1992) utilizaron marcadores RFLP para realizar una selección temprana de árboles de manzana en semillero, esto con el fin de acortar el tiempo y reducir los costos en los programas de mejoramiento genético. Si la selección de los árboles se realizara de manera tradicional, es decir, esperando a que los mismos que expresen la característica buscada (por ejemplo sabor de fruto) todos los materiales se deberían mantener en el tiempo y en el espacio necesarios hasta las evaluaciones y selección, lo que implicaría un gasto, no necesariamente una inversión, de una gran cantidad de recursos en árboles que probablemente no serán seleccionados para continuar con el programa de mejoramiento.

Ejemplos de RAPD

Mediante el uso de la técnica RAPD se evaluó la estabilidad genética de las selecciones regeneradas *in vitro* de *Annona cherimola* y *A. muricata*. 29 iniciadores fueron evaluados, de ellos seis fueron seleccionados por su patrón de repetición en ambas especies y selecciones. Los resultados confirmaron la estabilidad genética de las plantas micropropagadas de acuerdo con los iniciadores seleccionados. Esta investigación presenta por primera vez, hasta donde es conocido, un protocolo que permite la propagación clonal *in vitro* de

A. cherimola y *A. muricata*, el cual es confirmado por la técnica molecular RAPD. Con este protocolo se pueden regenerar y propagar árboles selectos de *A. cherimola* y *A. muricata* y conservando la estabilidad genética de los mismos, por lo que se puede garantizar que el material propagado es “fiel al tipo” (Bridg 2001).

Se utilizó la tecnología RAPD para estudiar la variabilidad existente en un banco de germoplasma de guisante, con objeto de establecer una colección nuclear, además para la identificación de genes de interés agronómico, los cuales serán utilizados en los programas de mejora (SIDTA 1999).

Con el uso de los marcadores RAPD fue posible caracterizar los genotipos de cacao pertenecientes a la colección 95 de la Estación Experimental de Ocumare de la Costa, Aragua, Venezuela. Los resultados permitieron la clasificación de los árboles de cacao en dos grandes grupos; cacaos criollos antiguos y cacaos criollos actuales. Además, se evidenció que los materiales que provienen de la misma localidad presentan patrones de banda similares y conforman grupo locales, posiblemente por presentar un origen común (Salazar y Efraín 2002).

Para extraer el ADN y poder caracterizar la población de árboles de cacao, utilizaron diferentes tipos de tejido foliar; tierno y fresco, sazón y fresco, tierno y almacenado en congelación y sazón y almacenado en congelación. Determinaron que el tejido idóneo para realizar la extracción es el tejido joven y fresco, ya que presentó menos problemas de oxidación y contenido de mucílago en las muestras procesadas, lo que favorece el proceso de extracción de los ácidos nucleicos. También encontraron que concentraciones de ADN por encima de 25 ng/ μ l resultan inhibitorias para el proceso de amplificación al azar del ADN y que los geles de agarosa al 2% permiten la mejor separación de los productos de amplificación así como una mayor resolución de los mismos. De los iniciadores evaluados, tres fueron los que produjeron la mayor cantidad de fragmentos amplificados, polimórficos y reproducibles (Salazar y Efraín 2002).

La técnica de RAPD es efectiva para caracterizar genotípicamente variedades de mango. Para la extracción del ADN, en mango, fue preferible usar el tejido foliar proveniente de hojas verdes con textura suave y tierna, evitando las de color bronce o rojizas. Las concentraciones de ADN genómico por debajo de 20 ng/ μ l

y por encima de 25 ng/ μ l resultaron ser inhibitorias para la amplificación mediante PCR. Los iniciadores que produjeron mayor cantidad de fragmentos polimórficos fueron OPA-04, OPA-15, OPB-06, OPB-07 y OPM-05. Para lograr una mejor resolución y definición de las bandas se usó un gel de agarosa al 1,4% con el bromuro de etidio incluido en concentraciones de 0,1-0,5 μ g/ml. Cada uno de los genotipos estudiados presentó un conjunto de patrones de bandas RAPD que le son característicos y permite su identificación. A pesar de la gran uniformidad morfológica que se observó en la población de árboles, con solo el uso de los iniciadores mencionados se logró separar genotípicamente los materiales de la colección, lo que demuestra el poder de resolución de la técnica para discriminar, a nivel de variedad, en esta especie (Salazar y Efraín 2002).

Galderisi *et al.* (1999) utilizaron RAPD para distinguir entre varios clones de seis cultivares de *Ficus carica*. La utilización de los marcadores moleculares permitió la identificación exacta, luego se estimó la relación genética entre los cultivares y sus clones.

Ejemplos de AFLP

Eiadthong *et al.* (2000) analizaron la relación filogenética entre 14 especies de *Mangifera*, incluyendo tres de importancia económica (mango común; *M. indica*, mango caballo; *M. foetida* y mango kwini; *M. odorata*) la relación la efectuaron comparando 217 marcadores AFLP. Para el análisis utilizaron los métodos UPGMA (unweighted pair grouping method using arithmetic averages) y NJ (neighbour-joining). Además se incluyeron el marañón (*Anacardium occidentale*) y la gandaria (*Bouea macrophylla*) como grupos externos. Encontraron: que el mango común está cercanamente relacionado con *M. sylvatica*, *M. laurina* y *M. oblongifolia*. La variación intraespecífica entre siete cultivares de mango común fue más pequeña que la variación interespecífica y estos cultivares fueron incluidos en un mismo grupo de *M. indica* en ambos métodos usados. *M. macrocarpa*, *M. foetida* y *M. odorata* también están bastante relacionadas con *M. indica* según UPGMA y NJ. No obstante, estas tres especies son clasificadas en un subgénero diferente (subgénero *Limus*) y *M. indica* pertenece al subgénero *Mangifera*. La técnica AFLP fue confirmada como de mucha utilidad en los análisis filogenéticos.

García-Mas *et al.* (2000) evaluaron tres tipos de marcadores moleculares; AFLP, RAPD y RFLP para medir la diversidad genética entre seis variedades de melones (Piel de sapo, Ogen, PI161375, PI414723, Agrestis y C105). El análisis de los grupos ("cluster") realizado usando los tres tipos de marcadores, separan los genotipos en dos grupos principales: (1) los de tipo dulce, que son los melones cultivados (Piel de sapo y Ogen) y (2) los exóticos, tipos no cultivados (resto de genotipos). Con los datos obtenidos se sugiere que los tres tipos de marcadores utilizados son informativos. El marcador AFLP da la mayor eficiencia en la detección del polimorfismo.

Ejemplos de SSR

Crouch *et al.* (2000b) construyeron iniciadores a partir de las regiones genómicas que bordean varios microsátelites de *Musa* con la idea de detectar polimorfismo en los materiales de la colección. Con la especificidad de los iniciadores desarrollados se logró distinguir entre los diversos materiales del germoplasma; por ejemplo, híbridos triploides y tetraploides de familias híbridas de plátanos. Aun más, los marcadores permitieron demostrar la ocurrencia de recombinación durante la formación de gametos 2n a partir de plátanos triploides y la heterocigotividad de una accesión de banano comúnmente utilizada como un genotipo "fiel al tipo" en estudios genéticos y programas de mejoramiento.

Lavi *et al.* (1994) generaron un SSR útil como marcador del ADN. Para la construcción se utilizó una librería genómica de ADN para aguacate (*Persea americana*). Para la creación de la librería se realizaron cuatro pruebas con los dinucleótidos (AG), (AT), (GC) y (CA). Luego, los clones positivos fueron secuenciados para validar la presencia de los SSRs y para generar los iniciadores PCR basados en las secuencias simples repetidas de los flancos. Se sintetizaron 26 pares de iniciadores que generaron productos PCR en el primer tamizado. El SSR A1E11 tiene 11 alelos y el A3F8 tiene ocho. Los SSRs fueron heredados en distribución Mendeliana.

Lai *et al.* (2001) analizaron 37 muestras de té (*Camellia sinensis*) procedentes de China, Assam y Taiwán, mediante microsátelites. Con la información obtenida determinaron que la diversidad de genes intrapoblación es mayor que la interpoblación y que la

mayor diversidad dentro de una población ocurre en los materiales silvestres de Taiwán. Además desarrollaron un dendrograma, en éste se aprecia que el té nativo de Taiwán se une cercanamente con los materiales de Assam, luego con los materiales de China y por último con los híbridos de Taiwán.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a Víctor Jiménez por la revisión realizada y comentarios aportados al presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- ALBANY, N.; VILCHEZ, J.; NAVA, A.; GONZÁLEZ, M.; CASTRO DE RINCON, C. 1998. El análisis de conglomerado para complementar el estudio de patrones electroforéticos en *Psidium* spp. Revista Facultad de Agronomía - LUZ (Venezuela) 15:142-152.
- ALSTON, F.H.; BATTLE, I. 1992. Genetic markers in apple breeding. *Phytoparasitica* 20:89-92.
- ARADHYA, M.; MANSHARDT, R.; ZEE, F.; MORDEN, C. 1999. A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46(6):579-586.
- ARCHAK, S.; GAIKMAD, A.B.; GAUTAM, D.; RAO, E.V.; SWAMY, K.R.; KARIHALOO, J.L. 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 46(3):362-369.
- ASHWORTH, V.E.T.; CLEGG, M.T. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94(5):407-415.
- AUKAR, A.P.; LEMOS, E.G.; OLIVEIRA, J.C. 2002. Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(3):738-740.
- BECERRA, V.; PAREDES, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* 60(3):270-281.
- AGRONOMÍA MESOAMERICANA 17(2): 221-242. 2006

- BERNATZKY, R. 1988. Restriction fragment length polymorphism. In: Gelvin, S.B.; Schilperoort, R.A. eds. Plant Molecular Biology Manual. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 1-18p.
- BILLOTTE, N.; COUVREUR, T.; MARSEILLAC, N.; BROTTIER, P.; PERTHUIS, B.; VALLEJO, M.; NOYER, J.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; RISTERUCCI, A.M.; PINTAUD, J. 2004. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxon utility within the tribe Cocoeae. *Molecular Ecology Notes* 4(4):580-582.
- BILLOTTE, N.; MARSEILLAC, N.; RISTERUCCI, A.M.; ADON, B.; BROTTIER, P.; BAURENS, F.C.; SINGH, R.; HERRAN, A.; ASMADY, H.; AMBLARD, P.; DURAND-GASSELIN, T.; COURTOIS, B.; ASMONO, D.; CHEAH, S.C.; ROHDE, W.; RITTER, E.; CHARRIER, A. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics* 110(4):754-765.
- BIRNBAUM, K.; DESALLE, R.; PETERS, C.; BENFEY, P. 2003. Integrating gene flow, crop biology, and farm management in on-farm conservation of Avocado (*Persea americana*, Lauraceae). *American Journal of Botany* 90(11):1619-1627.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIES, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- BRIDG, H. 2001. Estabilidad genética en *Annona cherimola* y *A. muricata* (en línea). Berlín, Alemania. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en: http://arc.cs.odu.edu:8080/dp9/getrecord/oai_dc/oai:HUBerlin:dissertationen/bridg-hannia-2000-03-24.
- BROWN, J.; LAURENTÍN, H.; DÁVILA, M. 2003. Genetic relationship between *Annona muricata* L. accessions using RAPD markers. *Fruits* 58(5):255-259.
- CARDEÑA, R.; OROPEZA, C.; ZIZUMBO, D. 1998. Leaf proteins as markers useful in the genetic improvement of coconut palms. *Euphytica* 102:81-86.
- CARDOSO, S.R.; ELOY, N.B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9(11):1753.
- CARREEL, F.; GONZALEZ de LEON, D.; LAGODA, P.; LANAUD, C.; JENNY, C.; HORRY, J. P.; TEZENAS du MONTCEL, H. 2002. Ascertainning maternal and paternal linaje within *Musa* by chloroplast and mitochondrial DNA RFLP analysis. *Genome* 45(4):679-692.
- CERVERA, M.; CABEZAS, J.; MARTÍNEZ, J. 2002. Análisis genético de la vid (en línea). Madrid, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.rub.es/ace/ciencia56_1.htm
- CLEMENT, C. R.; REIS, N. S.; PICANCO, D.; ASTOLFI-FILHO, S.; NÚÑES, Y.; TORRES, V.; GALLEGO, F. 2002. Use of AFLPs to distinguish landraces of peji-baye (*Bactris gasipaes*) in Brazilian Amazonia. *Scientia Agricola* 59(4):749-753.
- CROUCH, H.K.; CROUCH, J.H.; MADSEN, S.; VUYLS-TEKE, D.R.; ORTIZ, R. 2000a. Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landrace (*Musa* spp., AAB, group). *Theoretical and Applied Genetics* 101(7):1056-1065.
- CROUCH, J.; ORTIZ, R.; CROUCH, H.; JARRET, R.; FORD-LLOYD, B.; HOWELL, E.; NEWBURY, H.; CRAENEN, K.; KARAMURA, E.; VUYLS-TEKE, D. 2000b. Utilization of molecular genetic techniques in support of plantain and banana improvement. *Acta Horticulturae* 540:185-191.
- CROUZILLAT, D.; MÉNARD, B.; MORA, A.; PHILLIPS, W.; PÉTIARD, V. 2000a. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Yield QTL detection and stability over 15 years. *Euphytica* 114:13-23.
- CROUZILLAT, D.; PHILLIPS, W.; FRITZ, P.; PÉTIARD, V. 2000b. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. *Euphytica* 114:25-36.
- DECKER-WALTERS, D.S.; CHUNG, S.M.; STAUB, J.E.; QUEMADA, H.D.; LÓPEZ-SESÉ, A.I. 2002. The origin and genetic affinities of wild populations of melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae) in North America. *Plant Systematic and Evolution* 233(3-4):183-197.
- DIAS, L.A.; MARITA, J.; CRUZ, C.; DE BARROS, E.G.; FERNANDES, T.M. 2003. Genetic distance and its association with heterosis in cacao. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46(3):339-348.
- DILLON, S.; RAMAGE, C.; DREW, R.; ASHMORE, S. 2005. Genetic mapping of a PRSV-P resistance gene in "highland papaya" based on inheritance of RAF markers. *Euphytica* 145(1-2):11-23.

- DUVAL, M.F.; NOYER, J.L.; PERRIER, X.; EECKEN-DRUGGE, C.; HAMON, P. 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102(1):83-90.
- EIADTHONG, W.; YONEMORI, K.; KANZAKI, S.; SUGIURA, A.; UTSUNOMIYA, N.; SUBHADRA-BANDHU, S.; SURANANT, S. 2000. Amplified fragment length polymorphism analysis for studying genetic relationships among *Mangifera* species in Thailand. *Scientia Agriculture Sinica* 33(3):19-24.
- ERLICH, H. 1989. PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. Stockton. New York. USA. 246p.
- FAURÉ, S.; NOYER, J. L.; HORRY, J. P.; BAKRY, F.; LANAUD, C.; GONZÁLEZ de LEÓN, D. 1993. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). *Theoretical and Applied Genetics* 87(4):517-526.
- FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(3):221-227.
- FIEDLER, J.; BUFLER, G.; BANGERTH, F. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica* 101:249-255.
- FORREST, G. 1994. Biochemical markers in tree improvement programmes. *Forestry-Abstracts* 55(2):123-153.
- GALDERISI, U.; CIPOLLARO, M.; BERNARDO, G.; MASI, L.; GALANO, G.; CASCINO, A. 1999. Identification of the edible fig 'Bianco del Cilento' by random amplified polymorphic DNA analysis. *HortScience* 34(7):1263-1265.
- GARCIA-MAS, J.; OLIVER, M.; GOMEZ-PANIAGUA, H.; VICENTE, M. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theoretical and Applied Genetics* 101(5-6):860-864.
- GE, X.J.; LIU, M.H.; WANG, W.K.; SCHAAL, B.A.; CHIANG, T.Y. 2005. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. *Molecular Ecology* 14(4):933.
- GONZALEZ-PEREZ, M. A.; CAUJAPE-CASTELLS, J.; SOSA, P. A. 2004. Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis* (Arecaceae): implications for conservation. *Heredity* 93(3): 307-315.
- GONZALO, M.; OLIVER, M.; GARCIA-MAS, J.; MONFORT, A.; DOLCET-SANJUAN, R.; KATZIR, N.; ARÚS, P.; MONFORTE, A. 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 802-811.
- GRAHAM, J.; McNICOL, R.J. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 90(7-8):1128-1132.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, J.; SAMBROOK, J. 1974. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Biological Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA. Cold Spring Harbor Press. 39:439-449.
- GROSSER, J.W.; MOURAO, F.A.; GMITTER, F.G.; LOUZADA, E.S.; JIANG, J.; BAERGEN, K.; QUIROS, A.; CABASSON, C.; SCHELL, J.L.; CHANDLER, J.L. 1996. Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 92(5):577-582.
- HAINES, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvement: with special reference to developing countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma. FAO Forestry Paper 118. 230p.
- HARRIS, S.A.; HUGHES, C.E.; ABBOTT, R.J.; INGRAM, R. 1994. Genetic variation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Silvae Genetica* 43(2-3):159-167.
- HAWKINS, L.K.; DANE, F.; KUBISIAK, T.L.; RHODES, B.B.; JARRET, R.L. 2001. Linkage mapping in a watermelon population segregating for fusarium wilt resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126(3):344-350.
- HEATON, H.J.; WHITKUS, R.; GÓMEZ-POMPA, A. 1999. Extreme ecological and phenotypic differences in the tropical tree chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) are not matched by genetic divergence: random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Molecular Ecology* 8(4):627.
- HELENTJARIS, T.; KING, G.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, C.; WEGMAN, S. 1985. Restriction fragment length polymorphisms as probes

- for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Molecular Biology* 5:109-118.
- HEMANTH, K.N.V.; NARAYANASWAMY, P.; THEERTHA, P.D.; MUKUNDA, G.K.; SONDUR, S.N. 2001. Estimation of genetic diversity of commercial mango (*Mangifera indica* L.) cultivars using RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76(5):529-533.
- HONSHO, C.; NISHIYAMA, K.; EIADTHONG, W.; YONEMORI, K. 2005. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango (*Mangifera indica*). *Molecular Ecology Notes* 5(1):152.
- JARRET, R.L.; LITZ, R.E. 1986. Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica* 35(2):539-549.
- KAEMMER, D.; FISCHER, D.; JARRET, R.; BAURENS, F.; GRAPIN, A.; DAMBIER, D.; NOYER, J.; LANAUD, C.; KAHL, G.; LAGODA, P. 1997. Molecular breeding in the genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology. *Euphytica* 96(1):49-63.
- KAHANGI, E.M.; LAWTON, M.A.; KUMAR, C.A. 2002. RAPD profiling of some banana varieties selected by small-scale farmers in Kenya. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77(4):393-398.
- KANASHIRO, M.; HARRIS, S.A.; SIMONS, A. 1997. RAPD diversity in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl., Lecythydaceae). *Silvae Genetica* 46(4):219-223.
- KARP, A.; EDWARDS, K. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.; AYAD, W.; HODGKIN, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma Italia. 47p.
- KASHKUSH, K.; JINGGUI, F.; TOMER, E.; HILLEL, J.; LAVI, U. 2001. Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). *Euphytica* 122(1):129-136.
- KATO, C.Y.; NAGAI, C.; MOORE, P.H.; ZEE, F.; KIM, M.S.; STEIGER, D.L.; MING, R. 2005. Intra-specific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51(8):815-825.
- KRUEGER, R.; ROOSE, M. 2003. Use of molecular marker in the management of citrus germplasm resources. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(6):827-837.
- LAGERCRANTZ, U.; ELLENGREN, H.; ANDERSSON, L. 1993. The abundance of microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* 21:1111-1115.
- LAI, J.; YANG, W.; HSIAO, J. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42(2):93-100.
- LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.; PIERETTI, I.; N'GORAN, J.; FARGEAS, D. 2004. Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Molecular Breeding* 13(3):211-227.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics* 261(2):259-266.
- LAVI, U.; AKKAYA, M.; BHAGWAT, A. 1994. Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* M.). *Euphytica* 80(3):171-177.
- LEBRUN, P.; N'CHO, Y.; SEGUIN, M.; GRIVET, L.; BAUDOUIN, L. 1998. Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Euphytica* 101:103-108.
- LEE, S. SHIN, J.S.; PARK, K.W.; HONG, Y.P. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 92(6):719-725.
- LERCETEAU, E.; FLIPO, S.; QUIROZ, J.; SORIA, J.; VINCENT, P.; CROUZILAT, D. 1997. Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. Accessions using DNA and morphological analyses. *Euphytica* 95(1):77-87.

- LEVI, A.; THOMAS, C.E.; KEINATH, A.P.; WEHNER, T. 2001. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48:559-566.
- LOWE, A.J.; GILLIES, A.C.M.; WILSON, J.; DAWSON, I.K. 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology* 9(7):831.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. 2004. Ecological genetics; design, analysis, and application. Blackwell Science. Victoria, Australia. 326 p.
- MACEDO, E.G.; SOARES, C.L.; ACTIS, H. 2002. Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica* 127(2): 179-184.
- MAYES, S.; JACK, P.; CORLEY, R.; NEI, M.; LI, W. 2000. The use of molecular markers to investigate the genetic structure of an oil palm breeding programme. *Heredity* 85(3):288-293.
- MHAMEED, S.; SHARON, D.; KAUFMAN, D.; LAHAV, E.; HILLEL, J.; DEGANI, C.; LAVI, U. 1997. Genetic relationship within avocado (*Persea americana* Mill) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94(2):279-286.
- MOORE, J.E.; XU, J.; MILLAR, B.C.; ELSHIBLY, S. 2002. Edible dates (*Phoenix dactylifera*), a potential source of *Cladosporium cladosporioides* and *Sporobolomyces roseus*: implications for public health. *Mycopathologia* 154(1):25-28.
- N-GORAN, J.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.; LANAUD, C. 2000. The genetic structure of cocoa populations (*Theobroma cacao* L.) revealed by RFLP analysis. *Euphytica* 115(2):83-90.
- OLIVER, M.; GARCÍA-MAS, J.; CARDÚS, M.; PUEYO, N.; LÓPEZ-SESÉ, A.; ARROYO, M.; GÓMEZ-PANIAGUA, H.; ARÚS, P.; C de VICENTE, M. 2001. Construction of a reference linkage map for melon. *Genome* 44(5):836-845.
- PARASNIS, A.S.; RAMAKRISHNA, W.; CHOWDARI, K.V.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. 1999. Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. *Theoretical and Applied Genetics* 99(6):1047-1052.
- PATERSON, A. 1996. Genome mapping in plants. Academic Press. California, USA. 330 p.
- PHILLIPS, W.; RODRÍGUEZ, H.; FRITZ, P. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- PILLAY, M.; NWAKANMA, D.C.; TENKOUANO, A. 2000. Identification of RAPD marker linked to A and B genome sequences in *Musa* L. *Genome* 43(5):763-767.
- POWELL, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In: Moss, J. P. ed. Biotechnology and crop improvement in Asia. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 297-322.
- PRAKASH, D. P.; NARAYANASWAMY, P.; SONDUR, S. N. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77(3):287-293.
- PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; GORAN, J.A.; LANAUD, C. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108(6):1151-1161.
- RABOIN, L.; CARREEL, F.; NOYER, J.; BAURENS, F.; HORY, J.; BAKRY, F.; MONTCEL, H.; GANRY, J.; LANAUD, C.; LAGODA, P. 2005. Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: Molecular identification of 2n restitution gamete donors and n gamete donors. *Molecular Breeding* 16(4):333-341.
- RALLO, P.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R.; TRUJILLO, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm
- RAMAGE, C.; SANDO, L.; PEACE, C.P.; CARROLL, B.L.; DREW, R. 2004. Genetic diversity revealed in the apomictic fruit species *Garcinia mangostana* L. (mangosteen). *Euphytica* 136(1):1-10.
- RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J.; PIETRETTI, I.; FLAMENT, M.; LANAUD, C. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* 101:948-955.
- RISTERUCCI, A.M.; DUVAL, M.F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology* 5(4):745-748.

- RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CABRAL, J.R. 2001. Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudananas* confirmed by RAPD markers. *Euphytica* 119(3):245-252.
- RUIZ, C.; PAZ BRETO, M.; ASÍNS, M.J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedling in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112(1):89-94.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- SALAZAR, Y.; EFRAÍN, G. 2002. Caracterización molecular de genotipos de mango y cacao (en línea). Aragua, Venezuela. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en: <http://www.bcar.bib.ve>
- SALIMATH, S.; De OLIVEIRA, A.; GODWIN, I.; BENNETZEN, J. 1996. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38:757-763.
- SÁNCHEZ, I. 2002. Búsqueda y aislamiento de marcadores moleculares en *Pleurotus ostreatus* (en línea). Navarra, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en www.unavarra.es/genmic/publicaciones/tfc/isabel-%20sanchez.htm
- SAXENA, S.; CHANDRA, R.; C.; SRIVASTAVA, A.P.; MISHRA, M.; PATHAK, R.K.; RANADE, S.A. 2005. Analysis of genetic diversity among papaya cultivar using Single Primer Amplification Reaction (SPAR) methods. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80(32):291-296.
- SCHNELL, R.J.; BROWN, J.S.; OLANO, C.T.; POWER, E.J.; KROL, C.A.; KUHN, D.N.; MOTAMAYOR, D.N. 2003. Evaluation of Avocado Germoplasm Using Microsatellite Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(6):881-889.
- SHARON, D.; HILLEL, J.; MHAMEED, S.; CREGAN, P.; LAHAV, E.; LAVI, U. 1998. Association between DNA markers and loci controlling Avocado traits. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123(6):1016-1022.
- SIDTA. 1999. Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Consultado 1 agosto 2002. Disponible en: <http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica>
- SONDUR, S.N.; MANSHARDT, R.M.; STILES, J.I. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93(4):547-553.
- SRIPAORAYA, S.; BLACKHALL, N.; MARCHANT, R.; POWER, J.; LOWE, K.; DAVEY, M. 2001. Relationships in pineapple by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Breeding* 120(3):265.
- STAUB, J.; DANIN, P.; FAZIO, G.; HOREJSI, T.; REIS, N.; KATZIR, N. 2000. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. *Euphytica* 115(3):225-241.
- SYED, N.; SURESHSUNDAR, S.; WILKINSON, M.; BHANU, B.; CAVALCANTI, J.; FLAVELL, A. 2005. Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development in cashew (*Anacardium occidentale* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 110(7):1195-1202.
- TANKSLEY, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.
- TANKSLEY, S. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27:205-233.
- TANKSLEY, S.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C. 1981. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato basis of an early screening procedure. *Theoretical and Applied Genetics* 60:291.
- TENKOUANO, A.; CROUCH, J.H.; CROUCH, H.K.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. 1999. Comparison of DNA marker and pedigree-based methods of genetic analysis in plantain and banana (*Musa* spp.) clones. II. Predicting hybrid performance. *Theoretical and Applied Genetics* 98(1):69-75.
- UDE, G.; PILLAY, M.; OGUNDIWIN, E.; TENKOUANO, A. 2003. Genetic diversity in an African plantain core collection using AFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107(2):248-255.
- UMA, S.; SIVA, S.; SARASWATHI, M.; DURAI, P.; SHARMA, T.; SINGH, D.; SELVARAJAN, R.; SATHIAMOORTHY, S. 2005. Studies on the origin and diversification of Indian wild banana (*Musa*