
MARCADOR RAPD ASOCIADO A LA RESISTENCIA

A Fusarium oxysporum EN *Musa*

Asia Y. Zambrano, Gustavo Martínez, Zulay Gutiérrez, Edwin Manzanilla, José Luís Vicente-Villardón y Jhonny R. Demey

RESUMEN

La marchitez por *Fusarium* constituye una de las enfermedades más destructivas en *Musa*, siendo causada por el hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. No se cuenta con control químico disponible, siendo la única medida posible la utilización de genotipos resistentes/tolerantes al patógeno. El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido la determinación de marcadores asociados a determinadas condiciones de importancia económica, constituyendo una estrategia de selección rápida, confiable y reproducible que acelera el mejoramiento a través del conocimiento, en estadios tempranos, de la reacción a una característica dada y su interacción con el geno-

tipo. En este estudio se determinó un marcador RAPD asociado a la resistencia de *Musa* a *F. oxysporum* utilizando ocho clones susceptibles y diez clones resistentes/tolerantes evaluados en el campo para la reacción a la enfermedad. Se encontró que el patrón obtenido con el iniciador OPK-03 produjo un fragmento de amplificación específico de 485pb presente en los clones susceptibles y ausente en los clones resistentes/tolerantes. El estudio de las relaciones genéticas entre genotipos susceptibles y los resistentes/tolerantes a *F. oxysporum*, empleando iniciadores RAPD, definió la existencia de un patrón polimorfo asociado a la resistencia a la enfermedad.

IDENTIFICATION OF RAPD MARKER LINKED TO RESISTANCE OF *Musa* TO *Fusarium oxysporum*

Asia Y. Zambrano, Gustavo Martínez, Zulay Gutiérrez, Edwin Manzanilla, José Luís Vicente-Villardón and Jhonny R Demey

SUMMARY

Fusarium wilt of banana is widely regarded as one of the most destructive plant diseases. It is caused by the soil-inhabiting fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. There is no chemical control available and the only way to control it is to utilize cultivars that are resistant/tolerant to the pathogen. The development of molecular techniques allows the determination of markers linked to certain conditions of economic importance and constitutes a strategy for fast, reliable and reproducible selection, accelerating the improvement through knowledge, in early states, of the reaction to a given characteristic and its

interaction with the genotype. In this study, a RAPD marker linked to resistance of *Musa* to *F. oxysporum* is reported. Eight susceptible and ten resistant/tolerant entrances evaluated in the field were used. The RAPD patterns obtained with the primer OPK-03 detected a major fragment of 485bp, only found in the susceptible entrances and absent in the resistant/tolerant entrances. The study of genetic relations between the genotypes susceptible and resistant/tolerant to *F. oxysporum*, using RAPD primers, defined the existence of an associated polymorphic pattern to the resistance to the disease.

Introducción

Los plátanos y bananas son el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz, siendo las frutas de exportación de mayor importancia del planeta (FAO, 2004). Además de constituir el alimento básico

de cerca de 500 millones de personas, representan una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. Se cultivan tanto en zonas tropicales como subtropicales, bajo diferentes sistemas, en 10 millones de ha en 120 países, con rendimientos entre 7 y 70ton·ha⁻¹

(FAO, 2004). Los países latinoamericanos y del Caribe producen el 90% del total de los plátanos y bananas que entran en el comercio internacional (FAO, 2004).

El género *Musa* L., familia Musaceae, esta representado por un amplio rango de cultivares diploides, triploides

y tetraploides de plátanos y bananas originados principalmente por hibridaciones intra e interespecíficas de dos especies diploides silvestres, *M. acuminata* Colla y *M. balbisiana* Colla, con genomas A y B, respectivamente (Crouch *et al.*, 2000; Silvana *et al.*, 2003). Bananas y plátanos

PALABRAS CLAVE / Banana / Mal de Panamá / Marcador RAPD / Selección Asistida por Marcadores /

Recibido: 12/02/2007. Modificado: 27/09/2007. Aceptado: 28/09/2007.

Asia Yusely Zambrano. Doctora en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela. Investigadora INIA-CENIAP. Maracay, Venezuela. Apdo. 4521. Maracay, 2101. Venezuela. e-mail: azambrano@inia.gov.ve

Gustavo Martínez. Master en Agronomía. Investigador INIA-CENIAP. Maracay, Venezuela.
Zulay Gutiérrez. Técnico Superior en Agropecuaria. Técnico Asociado a la Investigación INIA-CENIAP, Maracay, Venezuela.

Edwin Manzanilla. Técnico Superior en Agropecuaria. Técnico Asociado a la Investigación INIA-CENIAP, Maracay, Venezuela.

José Luís Vicente-Villardón. Doctor en Estadística. Profesor Titular Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, España.

Jhonny R. Demey. Master en Estadística. Bioestadístico. Centro de Biotecnología, Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Caracas. Venezuela. Apdo. 4521. Maracay, 2101. Venezuela. e-mail: jdemey@reaccun.ve

RESUMO

A Murcha de *Fusarium* constitui uma das enfermidades mais destrutivas em *Musa*, sendo causada pelo fungo do solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Não contamos com controle químico disponível, sendo a utilização de genótipos resistentes/tolerantes ao patógeno a única medida de controle possível. O desenvolvimento das técnicas moleculares tem permitido a determinação de marcadores associados a determinadas condições de importância econômica, constituindo uma estratégia de seleção rápida, confiável e reproduzível que acelera o melhoramento através do conhecimento, em estágios prematuros, da reação a uma característica dada e sua interação com o

genótipo. Neste estudo se determinou um marcador RAPD associado à resistência de *Musa* a *F. oxysporum* utilizando oito clones susceptíveis e dez clones resistentes/tolerantes avaliados no campo para a reação à enfermidade. Encontrou-se que o padrão obtido com o iniciador OPK-03 produziu um fragmento de amplificação específico de 485pb presente nos clones susceptíveis e, ausente nos clones resistentes/tolerantes. O estudo das relações genéticas entre genótipos susceptíveis e os resistentes/tolerantes a *F. oxysporum*, empregando iniciadores RAPD, definiu a existência de um padrão polimorfo associado à resistência à enfermidade.

se producen en la mayoría de los países, crecen en un amplio rango de ambientes y producen frutos durante todo el año.

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causa en *Musa* el marchitamiento o mal de Panamá, que es una de las enfermedades más destructivas en el cultivo y más ampliamente distribuida a nivel mundial. No hay control químico o cultural disponible, siendo la utilización de genotipos resistentes/tolerantes al patógeno (Buddenhagen, 1990; Javed *et al.*, 2004) la única manera de combatirla. El avance de los métodos de mejoramiento convencionales en *Musa* es generalmente impedido por la esterilidad causada por la condición triploide o por factores genéticos en el caso de los diploides (Javed y Othman, 2005).

La selección en el campo de genotipos resistentes o tolerantes a la marchitez por *Fusarium* es un proceso tedioso, costoso, largo y de intensas labores (Ho, 1999; Asif *et al.*, 2004), y los resultados necesitan ser confirmados por varios ciclos de selección. El desarrollo de estrategias de selección rápidas, confiables y reproducibles puede acelerar la selección y procurar consecuentemente el mejoramiento genético de los cultivos. Es aquí donde las técnicas de marcadores moleculares constituyen una poderosa herramienta a través de su uso,

entre otros, en estudios de diversidad, caracterización de germoplasma, huellas genéticas y de marcadores moleculares asociados a una determinada característica.

La técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico RAPD; (Williams *et al.*, 1990, 1993; Welsh y McClelland, 1990) ha sido empleada en *Musa* con varios propósitos, entre los cuales se encuentran estudios de diversidad genética a fin de separar accesiones de genotipos AAB y ABB (Pillay *et al.*, 2000, 2001; Visser, 2001; Uma *et al.*, 2006), identificar genomas AA, AAA, AAB, ABB y BB (Howell *et al.*, 1994; Thu *et al.*, 2002), detectar variantes somaclonales (García y Jiménez, 1999; Martin *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2006; Venkatachalam *et al.*, 2007), identificar enanismo en bananas Cavendish (Damasco *et al.*, 1996; Gubbuk *et al.*, 2004; Ramaje *et al.*, 2004) y detectar mutantes obtenidos por irradiación (Kaemmer *et al.*, 1992). Dicha técnica también ha sido utilizada en estudios de reacción a enfermedades en *Musa*, tales como identificación de genotipos resistentes y susceptibles a Sigatoca amarilla (Vidal y García, 2000), e identificación de genotipos resistentes/tolerantes y susceptibles a *Fusarium oxysporum* (Javed *et al.*, 2004; Javed y Othman, 2005).

El presente estudio pretende localizar marcadores

que se encuentren asociados a la resistencia de *Musa* al *F. oxysporum* utilizando clones susceptibles y resistentes/tolerantes evaluados en el campo para la reacción a la enfermedad, de modo que puedan ser empleados en un programa de mejoramiento.

Materiales y Métodos*Material Vegetal*

Se utilizó tejido foliar joven de plantas del Banco de Germoplasma de Musáceas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Maracay, Venezuela. Se emplearon 10 clones referidos en la literatura como genotipos resistentes/tolerantes a *F. oxysporum*: *Musa acuminata* (AA), Pigmeo enano (AAA), Pigmeo gigante (AAA), Clon 58 (AAA), Clon 59 (AAA), Gran nai (AAA), Valery (AAA), Fhia-1 (AAAB), Fhia-2 (AAAA) y Fhia-3 (AABB) y 8 clones referidos como genotipos susceptibles: Higate (AAA), Cuyaco (AAA), Cambur manzano amarillo (AAB), Cambur manzano enano (AAB), Cambur manzano verde (AAB), Cambur manzano pseudo tallo morado (AAB), Cuyaco gigante (AAA) y Coco (AAA); (Ploetz, 1992, 1994; Stover y Buddenhagen, 1986; Companion *et al.*, 2005).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en tejido foliar joven utilizando la metodología de miniextracción descrita por Zambrano *et al.* (2002), procediéndose a la determinación de su cantidad y calidad a través de electroforesis en geles de agarosa visualizados con bromuro de etidio.

Amplificación de RAPD

La amplificación de los RAPDs fue realizada según Zambrano *et al.* (2003) en una mezcla de reacción final de 25µl conteniendo 10mM Tris HCl (pH 9,0); 50mM KCl; 0,1% Triton® X-100; 2,5mM MgCl₂; 200µM de cada uno de los dNTPs, 0,2µM de iniciador, 1ng de albúmina de suero bovino, 25ng de ADN genómico y 0,5U de *Taq* ADN polimerasa (Promega). La mezcla de reacción fue cubierta con 15µl de aceite mineral. Para la amplificación fueron utilizados los siguientes iniciadores de Operon Technologies: OPA-04, OPA-06, OPA-07, OPA-10, OPA-15, OPB-04, OPB-06, OPB-07, OPB-10, OPC-03, OPC-06, OPC-13, OPC-14, OPK-03, OPK-05, OPK-15, OPK-16, OPK-18, OPK-20, OPM-03, OPM-04, OPM-07, OPM-10, OPM-14, OPM-18, OPM-20, OPY-03, OPY-06, OPY-07 y OPY-18. La amplificación fue realizada en un termociclador MJ Research PTC 200, se-

gún programa señalado en Zambrano *et al.* (2003), empleando un ciclo de de-naturalización inicial a 94°C por 5min, seguido de 45 ciclos de amplificación con un segmento de de-naturalización a 94°C por 1min, un segmento de alineamiento a 36°C por 30s, y extensión a 72°C por 2min, y un ciclo final de extensión a 72°C por 7min. La separación de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1,5% corridos con buffer Tris-borato (1X) pH 8,30:por 1,5h a 70V y un máximo de 20mA, visualizados con bromuro de etidio bajo luz UV, usando como marcador de peso molecular ADN de fago λ doblemente digerido con las endonucleasas *HindIII* y *EcoRI*. Con la finalidad de evaluar la reproducibilidad de los productos de amplificación de los RAPDs se realizaron tres repeticiones, seleccionando solo los polimorfismos que se mantenían en las tres réplicas. Los geles fueron digitalizados con un Gel Doc 2000 BIO RAD.

Análisis de Datos

Los fragmentos de amplificación obtenidos fueron codificados como 0 y 1 para fragmentos ausentes y presentes, respectivamente. Para determinar el nivel de polimorfismos y la capacidad discriminatoria de cada iniciador se calculó el porcentaje de bandas polimórficas, el contenido de información polimórfica (PIC) y el error estándar Bootstrap asociado a estos (Anderson *et al.*, 1993). Se determinó la probabilidad de obtener parejas idénticas de alelos en los clones según metodología descrita por Wetton *et al.* (1987) y Ramakrishna *et al.* (1994), modificada por Demey *et al.* (2003). Las relaciones genéticas entre los clones de *Musa* fueron estudiadas a través de la representación gráfica generada por el análisis de coordenadas principales (ACoP) y el biplot logístico externo (Vicente-Villardón *et al.*, 2006; Demey *et al.*, 2006a) usando como medida de disimilitud la debida

TABLA I
NIVEL DE POLIMORFISMO Y CAPACIDAD DISCRIMINATORIA DE LOS INICIADORES RAPD

Iniciador	Secuencia	Total de bandas	Bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas (95) ¹	Contenido de Información polimórfica (PIC)	Probabilidad de igual identidad
OPB-07	5'GAAACGGGTG3'	5	4	80,00	0,3540 (0,0044)	6,1 10 ⁻¹¹
OPK-03	5'CCAGCTTAGG3'	5	2	40,00	0,3719 (0,000)	1,3 10 ⁻⁰⁵
OPK-05	5'TCTGTGCGAGG3'	4	3	75,00	0,3600 (0,0070)	1,5 10 ⁻¹⁰
OPK-15	5'CCCGCTACAC3'	5	4	80,00	0,3480 (0,0170)	2,6 10 ⁻¹¹
OPM-04	5'GGCGGTTGCT3'	6	5	83,33	0,2632 (0,0473)	7,1 10 ⁻⁰⁹
OPM-10	5'TCTGGCGCAC3'	6	6	100,00	0,2821 (0,0508)	2,7 10 ⁻¹¹
OPM-14	5'AGGGTCGTTTC3'	6	6	100,00	0,2395 (0,0401)	4,1 10 ⁻⁰⁹
OPM-18	5CACCATCCGT3'	4	3	75,00	0,3058 (0,0125)	2,9 10 ⁻⁰⁸

¹ El locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común excede de 0,95. Números entre paréntesis se refieren al error estándar Bootstrap.

al coeficiente de Dice (Sneath y Sokal, 1973). Medidas de calidad de representación de individuos, grupos y variables (fragmentos de amplificación) fueron calculadas según metodología descrita por Demey *et al.* (2006a).

Todos los análisis se realizaron utilizando programas desarrollados en MATLAB versión 2006a (MathWorks, 2006).

Resultados y Discusión

El método de extracción de ADN fue simple, rápido y eficiente, produciendo entre 200 y 250ng/μl de ADN de buena calidad. De los treinta iniciadores de Operon Technologies utilizados solo ocho, OPB-07, OPK-03, OPK-05, OPK-15, OPM-04, OPM-10, OPM-14 y OPM-18 amplificaron, produciendo un total de 41 fragmentos reproducibles, de los cuales el 80,49% polimórficos con un tamaño entre 377 y 1346 pares de bases (pb) y una proporción de repetibilidad de 100%. La Tabla I muestra

que los iniciadores OPB-07, OPK-03, OPK-05 y OPK-15 fueron los más informativos, con valores de PIC superiores al 70% del intervalo teórico de 0,01 a 0,50.

La capacidad discriminatoria evaluada a través de la probabilidad de que dos clones diferentes tengan igual identidad muestra que los iniciadores con mayor PIC tienen mayor capacidad discriminatoria, con excepción del OPK-03. La probabilidad media de que dos clones diferentes tengan igual identidad utilizando los 8 iniciadores es de 1,57x10⁻⁷¹, estimación basada en el supuesto de que los fragmentos de amplificación generados por diferentes iniciadores no se superponen

(Ramakrishna *et al.*, 1994). Bajo este supuesto hasta 10⁷¹ clones pueden ser comparados simultáneamente en la región del genoma explorada con un alto grado de confianza en la identificación.

Los ocho iniciadores usados produjeron fragmentos polimórficos en los genotipos susceptibles y resistentes a *F. oxysporum*. Sin embargo, el iniciador OPK-03 produjo un fragmento de amplificación específico de 485pb presente en los genotipos susceptibles y ausente en los genotipos resistentes/tolerantes (Figura 1). Estos resultados concuerdan con los señalados por Javed *et al.* (2004) y Javed y Othoman (2005) referente a la asociación de un fragmento de am-

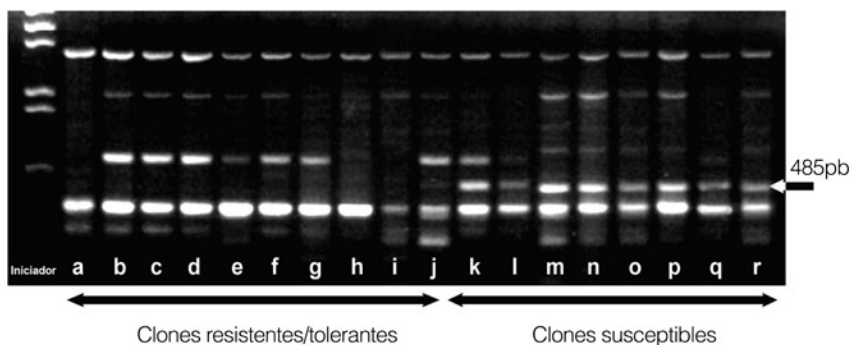


Figura 1. Polimorfismos RAPD del Iniciador OPK03, de izquierda a derecha. Marcador molecular ADN 1/*HindIII*-*EcoRI*. Los genotipos resistentes son a: *Musa acuminata* (AA), b: Pigmeo enano (AAA), c: Pigmeo gigante (AAA), d: Clon 58 (AAA), e: Clon 59 (AAA), f: Gran nai (AAA), g: Valery (AAA), h: Fhia-1 (AAAB), i: Fhia-2 (AAAA), y j: Fhia-3 (AABB). Los genotipos susceptibles son k: Higate (AAA), l: Cuyaco (AAA), m: Cambur manzano amarillo (AAB), n: Cambur manzano enano (AAB), o: Cambur manzano verde (AAB), p: Cambur manzano pseudo tallo morado (AAB), q: Cuyaco gigante (AAA), y r: Coco (AAA) a *F. Oxysporum*.

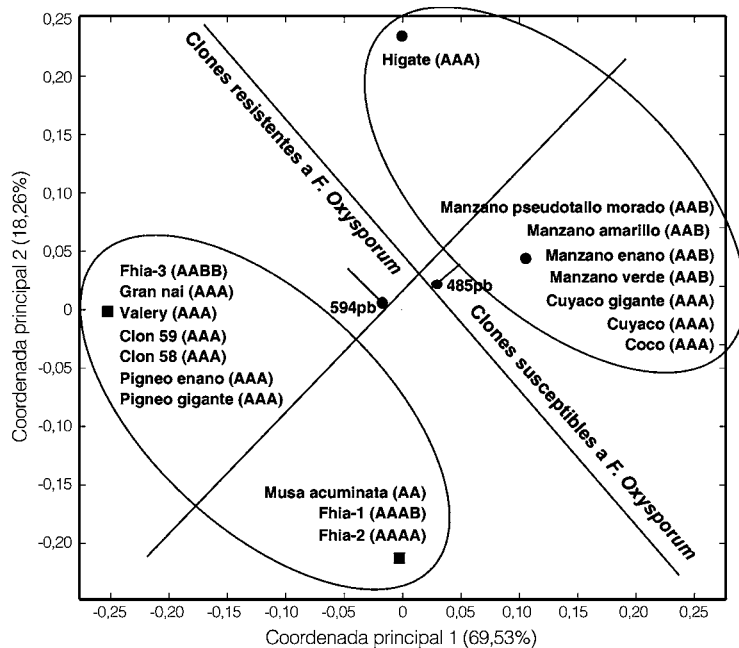


Figura 2. Relaciones genéticas entre clones resistentes/tolerantes y susceptibles, estudiadas a través de la representación gráfica generada por el análisis de coordenadas principales y el biplot logístico externo.

plificación RAPD específico en genotipos susceptibles a *F. oxysporum* de 400 y 300pb con los iniciadores OPA-03 y PRI-24, respectivamente, y de 1000pb con el iniciador PRI-21 en los genotipos resistentes al hongo.

La Figura 2 muestra la representación bi-dimensional generada por el análisis de coordenadas principales (ACoP), las dos primeras dimensiones explican el 87,79% de la inercia total. El diagrama de dispersión generado por la descomposición de la matriz de disimilitud debida al coeficiente de Dice para el iniciador OPK-03 revela una capacidad discriminadora específica y permite la formación de dos grupos principales; el primero constituido por los clones resistentes/tolerantes con un promedio de similitud genética de 0,9336 y un error estándar Bootstrap de 0,0106 y el segundo grupo con un promedio de similitud genética de 0,9724 y un error estándar Bootstrap de 0,0091 conformado por los clones susceptibles. La calidad de representación de los dos grupos, calculada

con los dos ejes retenidos, fue de 89,50% y 92,13%. La bondad de ajuste global, medida como porcentaje de clasificación correcta después de ajustar el biplot logístico, fue de 100%. Aunque el iniciador OPK-03 fue el de menor capacidad discriminadora entre los más informativos (Tabla I), muestra especificidad en la separación de los clones respecto a la reacción a *F. oxysporum*.

Adicionalmente, la Figura 2 muestra las regiones de predicción para los fragmentos polimórficos basadas en las proyecciones de los clones sobre los vectores de cada fragmento usando la regresión logística. La ecuación de la regresión predice la probabilidad que ese fragmento de amplificación esté presente en ese clon. Los fragmentos de 485pb y 594pb son representados por líneas que señalan en la dirección de las predicciones en función de la probabilidad y su largo esta inversamente relacionado con la capacidad discriminadora de cada fragmento, es decir, la capacidad de predecir la presencia o ausencia del fragmento de amplificación en

cada clon. Esta metodología es una alternativa a la forma clásica de representación, ya que permite visualizar de manera confiable las relaciones entre individuos y/o variables (Demey *et al.*, 2006a, b).

El análisis de la Figura 2 revela que el fragmento de 485pb es el de mayor capacidad discriminadora, está negativamente correlacionado con el de 594pb y confirma la utilidad del iniciador OPK-03 en la diferenciación de clones resistentes/tolerantes a *F. oxysporum*. Así mismo, el fragmento de 594pb, que divide en dos subgrupos a los dos grupos principales señalados, se puede asociar a la ubicación de los grupos genómicos a su centro de diversidad.

IPGRI (2006) señala el este de África como el centro de diversidad del genoma AAA, en tanto que el oeste y centro de África y Melanesia como el centro de diversidad de los genomas AAB, parte de AAA, diploides y tetraploides.

Este tipo de estudio representa una herramienta rápida, sencilla, económica y reproducible para detectar variación genética asociada a la resistencia/tolerancia a *F. oxysporum* en programas de mejoramiento de *Musa* asistido por selección utilizando marcadores moleculares. Los resultados demuestran la sensibilidad de la técnica RAPD para identificar marcadores asociados a características de interés agronómico. Adicionalmente se muestra que, aunque por su naturaleza de marcador dominante no permite discernir sobre el grado de co-dominancia, estos estudios son útiles en la discriminación de cultivares con niveles de ploidía variable.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del Instituto Nacional de Investigaciones

Agrícolas (INIA), Venezuela (Proyecto N° 602-04001).

REFERENCIAS

- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Zorreguis ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186.
- Asif MJ, Mak C, Othman RY (2004) Study of resistance of *Musa acuminata* to *Fusarium oxysporum* using RAPD markers. *Biol. Plant.* 48: 93-99.
- Buddenhagen IW (1990) Banana breeding and *Fusarium* wilt. En Ploetz RC (Ed.) *Fusarium wilt of Banana*. APS Press. St. Paul, MN, EEUU. pp 107-113.
- Companioni B, Mora N, Díaz L, Pérez A, Arbola M, Espinosa P, Hernández M, Ventura J, Pérez MC, Santos R, Lorenzo JC (2005) Identification of discriminant factors after treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* culture filtrates. *Plant Breed.* 124: 79-85.
- Crouch HK, Crouch JH, Madsen S, Vuylsteke DR, Ortiz R (2000) Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., AAB group). *Theor. Appl. Genet.* 100: 1056-1065.
- Damasco OP, Graham GC, Henry RJ, Adkins SW, Smith MK, Godwin ID (1996) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated cavendish (*Musa* ssp. AAA) bananas. *Plant Cell Reports.* 16: 118-123.
- Demey JR, Zambrano AY, Fuenmayor F, Segovia V (2003) Relación entre las características moleculares y morfológicas en una colección de Yuca. *Inter-ciencia* 28: 684-689.
- Demey JR, Galindo-Villardón MP, Vicente-Villardón JL, Zambrano AY (2006a) Classifying genotypes using Molecular Markers: A Biplot methodology approach. *XXIII Int. Biometric Conference*. Montreal, Canadá. THP3.326.
- Demey JR, Vicente-Villardón JL, Galindo-Villardón MP, Zambrano AY (2006b) Classifying genotypes using Molecular Markers: Vindicating Principal Coordinates Analysis. *Jornadas Internacionales de Estadística*. Rosario, Argentina. P-226.
- FAO (2004) FAOSTAT Agricultura. Superficie, producción y rendimiento. www.fao.org/
- García E, Jiménez C (1999) El Uso de marcadores moleculares en la detección de variantes so-

- maclonales en *Musa* sp. *Mem. Inst. Biol. Exp.* 2: 115-118.
- Gubbuk H, Pekmezci M, Omus AN, Erkan M (2004) Identification and selection of superior banana phenotypes in the cultivar Dwarf Cavendish using characteristics and RAPD markers. *Pakist. J. Bot.* 36: 331-342.
- Ho HY (1999) The development of Pisang Mutiara a *Fusarium* wilt-tolerant Rastali. En Wahab Z (Ed.) *Proc 1st Nat. Banana Seminar*. Awana Genteng, Malaysia. pp 144-147.
- Howell EC, Newbury JH, Swennen R, Wilhers LA, Ford-Lloyd BV (1994) The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germoplasm. *Genome*. 37: 328-332.
- IPGRI (2006) Global conservation strategy for *Musa* (Banana and Plantain). International Plant Genetic Resources Institute. Roma, Italia. 27pp.
- Javed MA, Othman RY (2005) Characterization of *Fusarium* wilt-resistant and *Fusarium* wilt-susceptible somaclones of banana cultivar Rastali (*Musa* AAB) by Random Amplified Polymorphic DNA and Retrotransposon markers. *Plant Molec. Biol. Rep.* 23: 241-249.
- Javed MA, Chai M, Othman RY (2004) Study of resistance to *Fusarium oxysporum* using RAPD markers. *Biol. Plant.* 48: 93-99.
- Kaemmer D, Afza R, Weising K, Kahl G, Novak FJ (1992) Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Biotechnology* 10: 1030-1035.
- Martin KP, Pachathundikandi SK, Zhang CL, Slater A, Madasery J (2006) RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42: 188-192.
- MathWorks (2006) *MATLAB Programming*. The MathWorks, Inc. Natick, MA, EEUU. 487 pp.
- Pillay N, Nwakanma DC, Tenkouano A (2000) Identification of RAPD markers to A and B genome sequences in *Musa* L. *Genome*. 43: 763-767.
- Pillay M, Ougundidiwin E, Nwakanma DC, Ude G, Tenkouano A (2001) Análisis de diversidad genética y relaciones en East African banana germoplasm. *Theor Appl Genet.* 102: 965-970.
- Ploetz RC (1992) Fusarium wilt of banana (Panama disease). En *Plant Diseases of International Importance*. Vol. III. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, EEUU. pp. 270-282.
- Ploetz RC (1994) Fusarium wilt and IMTP Phase II. En *The Improvement and Testing of Musa: a Global Partnership*. INIBAP. Montpellier, Francia. pp. 57-69.
- Ramaje 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). *Sci. Hort.* 103: 45-151
- Ramakrishna W, Lagu WD, Gupta VS, Ranjekar PK (1994) DNA fingerprinting in rice using oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet.* 88: 402-406.
- Ray T, Dutta I, Saha P, Das S, Roy SC (2006) Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85: 11-21.
- Silvana C, Tulmann A, de Oliveira S, Figueira A (2003) Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. *Euphytica* 132: 259-268.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco, CA, EEUU. 573 pp.
- Stover RH, Buddenhagen IW (1986) Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41: 175-191.
- Thu NX, Oanh LTL, Nhi HH (2002) Utilización de la técnica RAPD para la identificación y clasificación de algunos cultivares de banano en Vietnam. *Infomusa.11*: 48-49.
- Uma S, Siva SA, Saraswathi MS, Manickavasagam M, Durai P, Selvarajan R, Sathiamoorthy S (2006) Variation and intraspecific relationships in India wild *Musa balbisiana* (BB) population as evidenced by Random Amplified Polymorphic DNA. *Gen. Resour. Crop Evol.* 53: 349-355.
- Venkatachalam L, Sreedhar RV, Bhagyalakshmi N (2007) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shorts of banana using RAPD and ISSR markers. *E. J. Biotechnol.* 10. www.ej-biotechnology.info/content/vo-110issue1/full/12/.
- Vicente-Villardón JL, Galindo-Villardón MP, Blázquez-Zaballos A (2006) Logistic Biplots. En Greenacre M, Blasius J (Eds.) *Multiple correspondence analysis and related methods*. Chapman and Hall / CRC. EEUU. 608 pp.
- Vidal MC, García E (2000) Analysis of *Musa* spp somaclonal variant resistant to yellow sigatoca. *Plant Molec. Biol. Rep.* 18: 23-31.
- Visser AH (2001) Characterization of banana and plantain using random amplified polymorphic DNA markers. *Horticult. Abs-tr.72*: 2.1154.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Wetton JH, Carter RE, Parkin DT, Walters D (1987) Demographic study of wild House Sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327: 147-149.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218: 704-740.
- Zambrano AY, Demey JR, Martínez G, Fuenmayor F, Gutiérrez Z, Saldaña G, Torrealba M (2002) Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Agron. Trop.* 52: 235-243.
- Zambrano AY, Demey JR, Fuchs M, González V, Rea R, Desousa O, Gutiérrez Z (2003) Selection of sugarcane plants resistant to SCMV. *Plant Sci.* 165: 221-225.