

Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*

Claudia Medina¹, Ibonne García¹, Marina Caro¹, Fabio A. Aristizábal^{1,2}

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia.

² Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia. Correo electrónico: faaristizabalg@unal.edu.co

Recibido para evaluación: 30 de mayo de 2006

Aceptado para publicación: 21 de mayo de 2007

RESUMEN

La variación somaclonal es un evento que puede aparecer durante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; son modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados. Esta variación se ha usado en procesos de mejoramiento genético y para ampliar la variación genética natural; sin embargo, cuando el objetivo es la propagación clonal de una variedad, como en el caso de la micropropagación del árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*) mediante embriogénesis somática, la variación somaclonal resulta un fenómeno poco deseado. Este trabajo estableció una metodología para la detección de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis* de los clones IAN 710 e IAN 873 y en plantas donadoras de hojas para el proceso de embriogénesis somática, por medio de marcadores moleculares tipo AFLP. Esta técnica robusta y confiable permitió evidenciar variación entre plantas donadoras, y una alta tasa de variación somaclonal entre callos embriogénicos de *Hevea brasiliensis*, de igual manera entre callos embriogénicos y plantas donadoras.

Palabras clave: Variación somaclonal, embriogénesis somática, callo embriogénico, AFLP.

SUMMARY

AFLP analysis of somaclonal variation in *Hevea brasiliensis* somatic embryos

The somaclonal variation is an event that can appear during the *in vitro* vegetal tissues cultures as genetic modifications in cells and tissues. This variation has been used in processes of genetic improvement and to increase the natural genetic variation. Nevertheless, when the purpose is the clonal propagation, like rubber tree micropropagation case by somatic embryogenesis, somaclonal variation is an unwanted phenomenon. This research established a methodology for somaclonal variation detection using AFLP molecular markers in *Hevea brasiliensis* somatic embryos of the

clones IAN 710 and IAN 873 and plantlet donors of leaves for the process of somatic embryogenesis was used. This robust technique reliable allow showed variation within donating plants, and a high rate of somaclonal variation within embryogenic calluses of *Hevea brasiliensis*, likewise, showed high variation among embryogenic calluses and plantlet donors.

Key words: Somaclonal variation, somatic embryogenesis, embryogenic calluses, AFLP.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es una técnica de cultivo *in vitro*, de interés por sus aplicaciones potenciales en propagación clonal, transformación genética y estudios de desarrollo de embriones (1). Esta tecnología ha sido ampliamente usada en plantas de interés económico, y se presenta como una alternativa para la obtención de material vegetal de algunos forestales tales como *Hevea* (caucho natural). Se han desarrollado varios protocolos de embriogénesis somática para *Hevea brasiliensis*, de los cuales se han obtenido altas tasas de multiplicación (2). Idealmente, los embriones somáticos pueden exhibir características morfológicas similares a los embriones zigóticos. Sin embargo, se han observado anomalías morfológicas en embriones somáticos y la fidelidad genética de aquellos embriones es desconocida (1).

Antes que la embriogénesis somática en *Hevea brasiliensis* pueda ser explotada en la propagación masiva de material de interés comercial, la fidelidad genética de los embriones somáticos debe ser evaluada, y así mismo, verificar la producción de verdaderos clones, ya que, según Larkin y Scowcroft (3), puede existir una variabilidad genética que surge como consecuencia de la dediferenciación celular que ocurre durante el cultivo *in vitro*. Este fenómeno llamado "variación somaclonal", se define como la variación fenotípica y genética entre plantas propagadas clonalmente a partir de un clon donador simple (4). La variación somaclonal es de interés práctico debido a su uso potencial en el mejoramiento de plantas; sin embargo, si el principal objetivo es la propagación clonal *in vitro* o la transformación, este tipo de variación es un fenómeno no deseado (5). En plantas con ciclos de vida largos, este fenómeno constituye una desventaja para la micropropagación, ya que la mutación ocasional sólo puede ser detectada tardíamente, durante los estadios de desarrollo del árbol o aun en su descendencia (6).

El desarrollo de métodos por los cuales las plantas o embriones somáticos pueden ser rápidamente evaluados para detectar cambios genéticos derivados del

cultivo *in vitro* son indispensables. Los marcadores moleculares pueden ser usados para caracterizar la variación somaclonal con gran precisión y menos esfuerzo que los análisis fenotípicos y citológicos (7) y puede ser un medio de evaluar la estabilidad genética de plantas regeneradas y embriones somáticos obtenidos del cultivo *in vitro*. Marcadores como los RFLP han sido usados en varias especies, pero requieren el uso de sondas que hibriden con secuencias conocidas (5). Los RAPD, han mostrado ser una herramienta efectiva para detectar variación somaclonal en un gran número de especies como en centeno (8), durazno (9) y *Picea mariana* (10). Sin embargo, los RAPD han sido problemáticos e inconclusos en algunos casos, como en estudios que han indicado la no detección de variación somaclonal usando esta técnica.

Fourré y colaboradores (11) evaluaron la variación somaclonal en clones embriogénicos de Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst; aunque las variaciones se detectaron por análisis citogenéticos y morfogenéticos, no se observó ninguna usando RAPD. Munthali y colaboradores (12), empleando RAPD en plantas regeneradas de remolacha, obtuvieron 5.607 marcadores, de los cuales sólo tres fueron polimórficos (0,05%).

Otra técnica más recientemente desarrollada, Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos Amplificados, AFLP; permite la identificación de un gran número de polimorfismos con respecto a otras técnicas como los RFLP o los RAPD (13). Con los AFLP, los fragmentos de ADN son amplificados usando cebadores específicos como adaptadores, los cuales son ligados a esos fragmentos. Además, el análisis AFLP es relativamente fácil de ejecutar, es altamente reproducible y utiliza cantidades pequeñas de ADN. Sin embargo, sólo unos pocos estudios encaminados a detectar variación somaclonal han sido llevados a cabo aplicando esta técnica como en árboles y en embriones somáticos de pecan (1), *Arabidopsis thaliana* (5) y aliso (14, 15).

El estudio muestra la aplicabilidad de utilizar la técnica de los AFLP para evidenciar la variabilidad genética en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. Las comparaciones fueron hechas entre callos embriogénicos de un mismo clon (IAN 710 e IAN 873) y entre los mismos con los árboles donadores de cada clon.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes y semillas de cinco árboles de cada clon de *Hevea brasiliensis* (IAN 710 e IAN 873), que hacen parte del jardín clonal de San Juan

de Rioseco, departamento de Cundinamarca. Se obtuvieron 16 callos embriogénicos friables partiendo del material colectado, siguiendo la metodología propuesta por Fontanilla (16), de los cuales ocho por sus características, constituyeron el material de partida para el estudio por métodos moleculares.

Extracción del ADN

Para extraer el ADN genómico, tanto de hojas de donadores como de callos embriogénicos, se emplearon dos métodos: el propuesto por Dellaporta (17) y el basado en el tiocianato de guanidina (DNAzol®), con los que se obtuvieron concentraciones de 35-100 ng de ADN por 0,1 g de tejido foliar o callo.

Cuantificación del ADN

El ADN se cuantificó por valoración electroforética, comparándolo con concentraciones conocidas de ADN de fago lambda, y por espectrofotometría UV, empleando la relación de lectura de OD 260/280 (18). Se calcula la concentración del ADN asumiendo que la concentración del ADN de 50 µg/ml equivale a una OD de 1 a 260 nm (concentración del ADN = [OD 260] x [factor de dilución] x [50 µg ADN/1 OD]). La relación de 260/280, se consideró como medida de la pureza del ADN y debe permanecer entre 1,6 y 1,9.

Técnica de los AFLP

Los AFLP se realizaron con el kit de reactivos AFLP® Analysis system I y AFLP® Starter Primer Kit de Invitrogen™ life technologies (13). Del ADN previamente evaluado, se tomaron 250 ng de acuerdo con los requerimientos del kit. En tubos para PCR, se realizó la mezcla para la reacción de digestión simultánea con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *MseI*; se incubaron por dos horas a 37 °C y después se inactivaron las enzimas a 70 °C por 15 minutos, inmediatamente se llevó a cabo la reacción de ligación. La ligación de los adaptadores a los fragmentos digeridos se efectuó mediante la enzima T4 ligasa con la metodología del kit. La mezcla se agitó suavemente con vortex y se centrifugó para colectar el contenido, luego se incubó a 20 °C por dos horas. Una vez terminada la reacción de digestión-ligación, se diluyó la mezcla en *buffer* TE, en una proporción 2:10. La amplificación se efectuó en dos pasos consecutivos: el primero llamado preamplificación, donde el ADN genómico es amplificado con cebadores con un nucleótido selectivo y, el segundo, que es la amplificación selectiva, donde se usan dos cebadores que contienen cada uno tres nucleótidos selectivos. El kit permite evaluar 64 combinaciones de cebadores con tres bases de selección. Se utilizaron las combinaciones ACA-CTA y ACT-CAC, las cuales fueron las más polimórficas (datos no mostrados).

Los productos de la PCR se evaluaron en geles de acrilamida al 4%, corridos en condiciones denaturantes a 120 W constantes en *buffer* TBE 0,5X por 90 minutos a una temperatura de 55 °C en la cámara Sequi-Gen® GT Biorad. Las bandas se visualizaron mediante tinción con plata. Los perfiles electroforéticos obtenidos de cada gel se analizaron visualmente y se elaboró una matriz de presencia / ausencia; posteriormente, los datos se colocaron en un formato de Excel. La matriz de presencia/ausencia se analizó por medio del software NTSYSpC 2.0, mediante el algoritmo de distancias genéticas y se realizó el análisis de agrupamiento para obtener el dendograma. Los dendogramas de similaridad se construyeron con el algoritmo UPGMA (*unweighted pairwise groups method arithmetic average*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción del ADN

Con los tres métodos ensayados para la extracción del ADN, se obtuvo ADN genómico en diferentes concentraciones a partir de material foliar; sin embargo, sólo con el método comercial DNAzol® fue posible obtener ADN, ya que con el otro método sólo se logró obtener ARN.

El método basado en el tiocianato de guanidina (DNAzol®) (17), resultó muy efectivo para la extracción del ADN tanto de callo como de material foliar; sin embargo, el ADN obtenido a partir de material foliar mostró dificultad en la solubilización en TE; lo cual se superó dejando las muestras toda la noche en TE a 4 °C.

Análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante los AFLP

En reacciones de PCR en las que se emplearon dos combinaciones de cebadores E-ACA x M-CTA y E-ACT x M-CAC (Figuras 1A y 1B), se obtuvo un total de 131 fragmentos de restricción, de los cuales 125 resultaron polimórficos, es decir, un 95,4%, que es un alto polimorfismo, comparable en nivel al detectado en embriones somáticos de otras especies como pecan con 98,6% (1) y en plantas de *Arabidopsis thaliana* regeneradas a partir de callos embriogénicos las cuales mostraron 99,4% de polimorfismo (15). Por otro lado, Gutiérrez (15) encontró 56% de polimorfismo en embriones somáticos y en plantas de *Alnus acuminata* mientras que Macadán y colaboradores (19) detectaron el 67% de polimorfismo en embriones somáticos, en plantas regeneradas y en plantas de campo de lúpulo.

La técnica de los AFLP puede detectar un buen número de polimorfismos con tan solo uno o dos pares de cebadores. Para la combinación ACA-CTA, el análisis realizado de polimorfismo entre árboles de un mismo clon, arrojó un porcentaje de diferencia entre árboles del clon IAN 873 del 15,1%, mientras que en los árbo-

les del clon IAN 710 se encontró un porcentaje del 36,7% de polimorfismo. Entre los callos del clon IAN 873, se evidenció un nivel de polimorfismo del 63,29%, mientras que en los callos del clon IAN 710, el porcentaje fue del 53,1%. Cuando se compararon los callos del clon IAN 873 con el estadio de torpedó, se halló 72,1% de polimorfismo entre ellos, y cuando se realizó el análisis del polimorfismo entre árboles y callos de un mismo clon, el porcentaje que se encontró en el clon IAN 873 fue del 73,4% y en el clon IAN 710 fue del 93,6%.

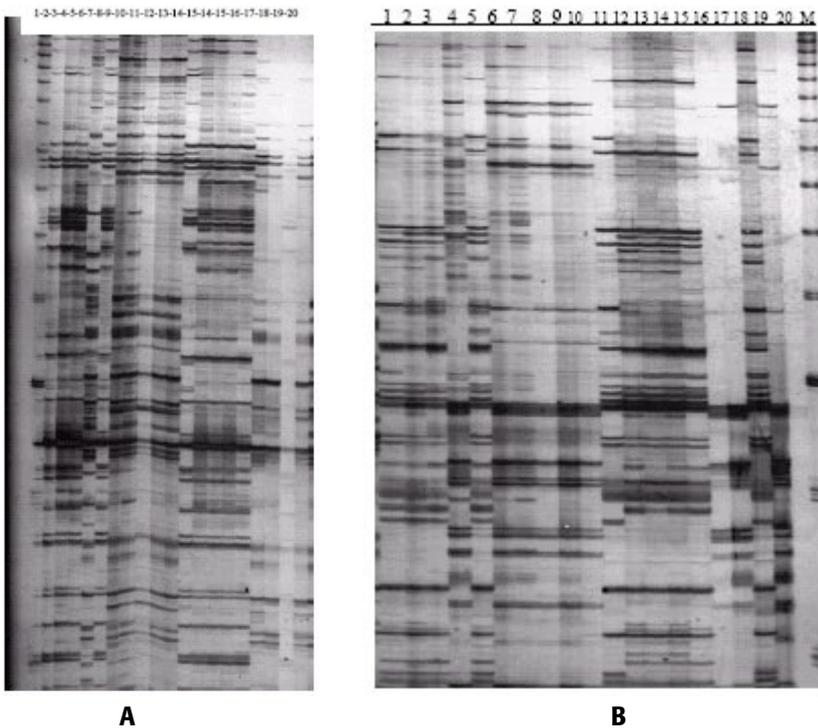


Figura 1.

A. Combinación de los cebadores de tres bases de selección E-ACA x M-CTA. Carril **1**. Árbol invernadero, **2**. Árbol IAN 873 No. 5, **3**. Árbol IAN 873 No. 1, **4**. Callo IAN 873 No. 1A, **5**. Callo IAN 873 No. 8A, **6**. Torpedó árbol invernadero, **7**. Callo IAN 710 No. 9, **8**. Callo IAN 710 No. 2A, **9**. Callo IAN 710 No. 7A, **10**. Callo IAN 710 No. 12, **11**. Árbol IAN 710 No. 1, **12**. Árbol IAN 710 No. 2, **13**. Árbol IAN 710 No. 3, **14**. Árbol IAN 710 No. 4, **15**. Árbol IAN 710 No. 5, **16**. Callo IAN 710 No. 10, **17**. Callo IAN 710 No. 10A, **18**. Árbol IAN 710 No. 1, **19**. Torpedó IAN 710 árbol inv., **20**. Callo IAN 710.

B. Combinación de los cebadores de tres bases de selección E-ACT x M-CAC. Carril **1**. Árbol invernadero, **2**. Árbol IAN 873 No. 5, **3**. Árbol IAN 873 No. 1, **4**. Callo IAN 873 No. 1A, **5**. Callo IAN 873 No. 8A, **6**. Torpedó árbol invernadero, **7**. Callo IAN 710 No.9, **8**. Callo IAN 710 No. 2A, **9**. Callo IAN 710 No. 7A, **10**. Callo IAN 710 No. 12, **11**. Árbol IAN 710 No. 1, **12**. Árbol IAN 710 No. 2, **13**. Árbol IAN 710 No. 3, **14**. Árbol IAN 710 No. 4, **15**. Árbol IAN 710 No.5, **16**. Callo IAN 710 No.10, **17**. Callo IAN 710 No.10A, **18**. Árbol IAN 710 No. 1, **19**. Torpedó IAN 710 árbol inv., **20**. Callo IAN 710.

Con los cebadores ACT-CAC, el porcentaje de polimorfismo entre árboles del clon IAN 873 fue del 17,3%, mientras que entre los árboles del clon IAN 710 fue del 42,3%. Entre los callos del clon IAN 873 el polimorfismo fue del 63,4% y el 26,9% entre los callos del clon IAN 710. Cuando se compararon árboles con callos del clon IAN 873, se encontró el 75% de polimorfismo, y entre árboles y callos del clon IAN 710, el 96,1%. El porcentaje de polimorfismo entre los callos de IAN 873 y el estadio de torpedo es de 71,1%. Si se comparan los resultados logrados con los estudios realizados por Vendrame y colaboradores (1), Polanco y Ruiz (5), Gutiérrez (15) o Magadán y colaboradores (19), se concluye que la técnica realmente es muy sensible y permite detectar una tasa alta de polimorfismo entre individuos.

En estudios como los citados por Vendrame y colaboradores (1) se identificaron 320 marcadores AFLP polimórficos en lechuga usando tan sólo tres pares de cebadores; en contraste trabajando con análisis RAPD en melocotón (1), se obtuvo un porcentaje de sólo 12 marcadores por cebador. Se requirieron 35 cebadores para detectar 418 marcadores y sólo 10 de los 35 cebadores revelaron polimorfismos de todos los genotipos evaluados. Utilizando RAPD en plantas regeneradas de remolacha, aunque obtuvieron un gran número de marcadores usando sólo cinco cebadores, se observaron sólo dos polimorfismos entre 4.557 marcadores de regenerantes primarios y un polimorfismo entre 1.050 marcadores de regenerantes secundarios (1). Jaya-Sankar y colaboradores (20) también emplearon los RAPD para analizar cambios *in vitro* en cultivos embriogénicos de dos plantaciones de mango, seleccionadas por la resistencia a *Colletotrichum gloeosporioides*, y obtuvieron 63 bandas (marcadores) con 15 cebadores. En la evaluación de diferentes genotipos de pecan, e requirieron 20 cebadores para obtener 120 marcadores RAPD (1).

Por tanto, la técnica de los RAPD puede detectar variabilidad dentro de líneas de cultivo de embriones somáticos de pecan y árboles de la misma línea de cultivo (1); sin embargo, en algunos estudios realizados a lo árboles de roble, no se detectó variación somaclonal en líneas celulares embriogénicas. Los datos expuestos muestran que, para muchas especies, la técnica de los AFLP resulta ventajosa para evaluar de la variación entre individuos de plantas, entre callos y entre plantas donadoras y callos embriogénicos sobre otras técnicas como los RAPD.

El análisis de agrupamiento para el material de *Hevea brasiliensis* en estudio (Figura 2), realizado a partir de los perfiles obtenidos por los AFLP mediante el algoritmo de similaridad de Nei (21) y el algoritmo de agrupamiento UPGMA, muestra que los árboles del clon IAN 710 en su mayoría son homogéneos entre sí, agrupándose los árboles 3 y 4 con una similaridad genética del 99,9% entre ellos; seguido de los árboles 2, 3 y 4, con una similaridad del 97%. Luego se

encuentran los árboles 2, 3, 4 y 5 con una similaridad del 94%. Pero, por otro lado, el árbol 1 se agrupa con el resto de árboles de este clon con una similaridad del 73%, indicando que posiblemente se trata de un clon diferente. Además, con la metodología utilizada, los resultados obtenidos muestran que un sólo callo derivado del clon IAN 873 se agrupó con el árbol donador (Figura 2), es decir que presenta mínima variación somaclonal; este callo, a diferencia de los demás, se obtuvo de tegumento interno. Ahora bien, este resultado podría indicar que el iniciar procesos de embriogénesis, partiendo de tegumento interno, podría ser una interesante alternativa para multiplicar el material; sería necesaria la aplicación de esta metodología a un mayor número de callos provenientes de tegumento interno de al menos dos clones a fin de establecer de manera consistente si a partir de éstos se puede obtener material vegetal con menor variación somaclonal.

Los resultados permiten corroborar que la variación observada entre árboles, no es consecuencia de la técnica, sino de un problema del material plantado en los jardines clonales, el cual no es homogéneo. Resultados que concuerdan con el estudio preliminar de caracterización molecular de *Hevea brasiliensis* realizado por el grupo de Investigación en Caucho Natural del IBUN, el cual muestra un alto porcentaje de variación entre árboles del clon IAN 873 y una variación intermedia entre árboles del clon IAN 710 (datos no publicados).

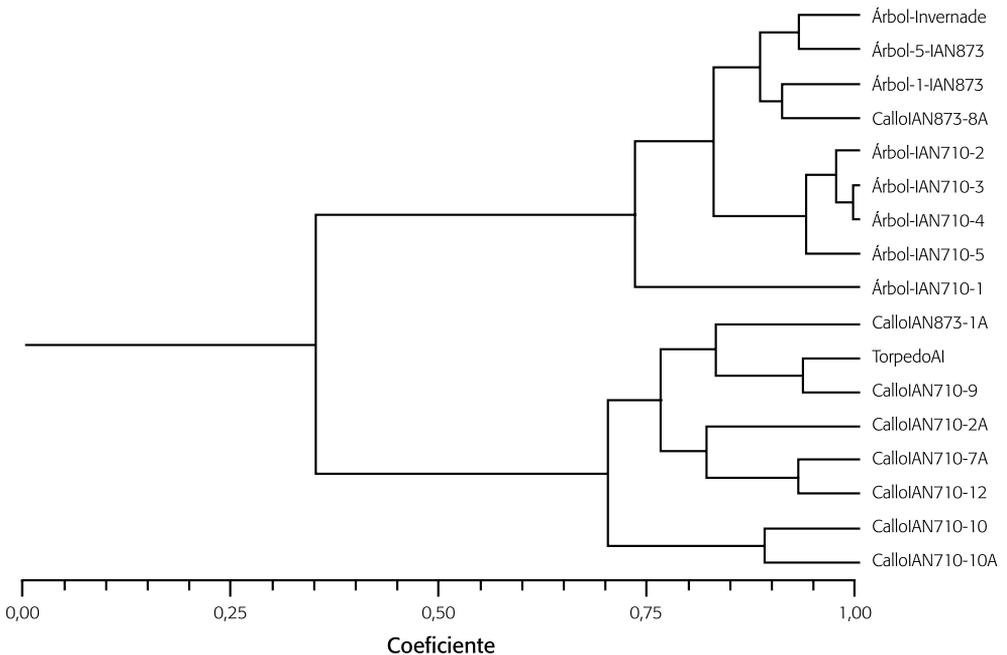


Figura 2. Dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles electroforéticos generados por los AFLP, mediante el software NTSYSpc 2.0.

Si durante el proceso de embriogénesis somática no se generara ningún tipo de cambio genético, se esperaría que los perfiles de los AFLP de los callos obtenidos de los árboles donadores deberían agruparse con los de los árboles de su mismo clon a una distancia genética mínima, lo que nos llevaría a plantear que no existe variación somaclonal; sin embargo, con el alto polimorfismo obtenido entre árboles y callos, y entre los mismos callos referidos anteriormente, y con una similitud máxima entre callos del 93% correspondientes al clon IAN 710 No. 7A y No. 12 (Figura 2) y una similitud mínima entre callos del 70%; por tanto aún teniendo en cuenta que hay diferencias importantes entre árboles de un mismo clon, cuando se relacionan los callos con los árboles de origen, se encuentra una baja similitud genética, con variabilidad mucho mayor que la existente entre los árboles de partida. Por otro lado, se destaca que los perfiles generados para la mayoría de los callos se agrupan entre sí alejándose de las plantas de origen (Figura 2), lo cual hace pensar en la existencia de variación somaclonal inducida a través del proceso de embriogénesis somática.

CONCLUSIONES

La metodología para la extracción de ADN, DNAzol®, reportada por Gutiérrez (14), permite obtener ADN genómico de buena calidad y cantidad requerido para el análisis por los AFLP. Se lograron obtener 100 ng/μL de ADN a partir del material foliar y 35 ng/μL a partir de callo. Las dos combinaciones ensayadas amplificaron el 99% de los individuos. La combinación E-ACA x M-CTA mostró mayor información que la combinación E-ACT x M-CAC; de cada una se obtuvieron más de 50 bandas. La combinación que mostró mayor número de polimorfismo fue ACA-CTA. El porcentaje obtenido del polimorfismo entre árboles de un mismo clon, nos permitió observar que el clon IAN 873 posee menor variación entre individuos que el clon IAN 710.

La obtención de marcadores moleculares polimórficos AFLP en *Hevea*, permite confirmar la aplicabilidad de esta técnica molecular al estudio de la estabilidad genética de los materiales embriogénicos. Estos resultados verifican que la técnica es válida para distinguir la variación genética entre líneas de cultivo de embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. La técnica de los AFLP puede fácilmente detectar variaciones genotípicas de una línea embriogénica a otra. A pesar de los pocos árboles analizados del clon IAN 710, se logró evidenciar la falta de la homogeneidad genética dentro del jardín clonal donde se realizó el muestreo. Los bajos porcentajes de similitud genética entre callos embriogénicos nos permiten verificar la existencia de una alta tasa de variación somaclonal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en especial al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y al laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. W.A. Vendrame, G. Kochert y H.Y. Wetzstein, AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos, *Plant Cell Reports*, **18**, 853 (1999).
2. P. Compagnon, "El caucho natural", CIRAD-CP, Francia, 1994.
3. P.J. Larkin y W.R. Scowcroft, Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theor. Appl. Genet.*, **60**, 197 (1981).
4. S.M. Kaeppler, H.F. Kaeppler y Y. Rhee, Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, *Plant Mol. Biol.*, **43**, 179 (2000).
5. C. Polanco y M.L. Ruiz, AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants, *Plant Science*, **162**, 817 (2002).
6. J.L. Fourré, P. Berger, L. Niquet y P. André, Somatic embryogenesis and somaclonal variation in *Norway spruce*: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches, *Theor. Appl. Genet.*, **94**, 159 (1997).
7. S. Cloutier y B.S. Landry, Molecular markers applied to plant tissue culture, *In vitro Cell Dev. Biol.*, **30**, 32 (1994).
8. R. Linacero, E. Freitas Alves, y A.M. Vázquez, Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye, *Theor. Appl. Genet.*, **100**, 506 (2000).
9. G. Hahmi, R. Huettel, R. Meyer, L. Krusberg y F. Hammerschlag, RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus culture of peach, *Plant Cell Rep.*, **16**, 624 (1997).
10. N. Isabel, L. Tremblay, M. Michaud, F.M. Tremblay y J. Bousquet, RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill) B.S.P., *Theor. Appl. Genet.*, **86**, 81 (1993).

11. J.L. Fourré, P. Berger, L. Niquet y P. André, Somatic embryogenesis and somaclonal variation in *Norway spruce*: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches, *Theor. Appl. Genet.*, **94**, 159 (1997).
12. M.T. Munthali, H.J. Newbury y B.V. Ford-Lloyd, The detection of somaclonal variants of beet using RAPD, *Plant Cell Rep.*, **15**, 474 (1996).
13. P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407 (1995).
14. L.G. Gutiérrez, "Embríogenesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares", Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España, 2002.
15. L.G. Gutiérrez, Marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de aliso *Alnus acuminata* H.B.K., *Revista Scientia et Técnica* 25, Universidad Tecnológica de Pereira (2004).
16. I.M. Fontanilla, "Embríogenesis somática en *Hevea brasiliensis* a partir de segmentos de hojas y yemas de los clones IAN 710, IAN 873 y RRIM", Tesis de Grado, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia, 2005.
17. S.L. Dellaporta, J Wood y J.B. Hicks, A plant DNA minipreparation: Version II, *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**, 19 (1983).
18. J. Sambrook, E.F. Fritsh y T. Maniatis, "Molecular cloning. A laboratory manual", 2nd edition, 3 vols., Cold Spring Harbory Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
19. J.A. Magadán, D. Martínez, J.M. Jiménez, R. Arroyo, J.M. Martínez-Zapater y M.A. Revilla, 2001. Evaluation of somaclonal variation in hops by AFLPs. URL: <http://www.stmlf.bayern.de/lbp/info/ho/ihb/poster4.pdf>, octubre 2006.
20. S. Jaya-Sankar, R.E. Litz, R.J. Schnell y A.C. Hernández, Embryogenic mango cultures selected for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate show variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, *In vitro Cell Dev. Biol.*, **34**, 112 (1998).
21. M. Nei, Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3321 (1973).