



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Diversidad genética de bananos y bananitos con microsatélites fluorescentes

Madeleine Lieset Gutiérrez Salamanca

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2020

Diversidad genética de bananos y bananitos con microsatélites fluorescentes

Madeleine Lieset Gutierrez Salamanca

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biológicas

Director:

PhD. Jaime Eduardo Muñoz Flórez

Codirector:

M.Sc. Álvaro Caicedo Arana

Línea de Investigación:

Biotecnología vegetal

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en diversidad biológica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2020

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr este objetivo.

Especialmente,

A mis padres, que con su esfuerzo, amor y dedicación han forjado mi vida, lo cual ha sido fundamental para el cumplimiento de cada una de mis metas.

“En mi opinión, lo único que necesita la fe es el convencimiento de que esforzándonos en hacer lo mejor que podemos nos acercaremos al éxito, y que el éxito de nuestros propósitos, la mejora de la humanidad de hoy y del futuro, merece la pena de conseguirse”.

Rosalind Franklin

Resumen

El banano (*Musa spp.*) es fundamental para la economía de países en desarrollo. Por estas razones, la caracterización de la diversidad genética de Musáceas es esencial para el manejo y aprovechamiento de los recursos genéticos. En el presente estudio se evaluaron 99 accesiones de la colección de *Musa spp.*, que hacen parte del banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA, Palmira, Valle del Cauca), por medio de doce microsatélites fluorescentes (SSR). Un total de 206 alelos fueron identificados, con un contenido de información polimórfica (PIC) promedio de 0.106 y un índice de marcador (IM) promedio de 1.377, indicando la presencia de marcadores polimórficos e informativos. La heterocigosidad esperada y número de alelos fue superior en los bananos y ornamentales ($He=0.836 - Na= 14.1$ y $He=0.848 - Na= 8.5$, respectivamente), mientras que los bananitos presentaron valores inferiores ($He=0.569 - Na= 6.25$). El análisis de disimilaridad permitió identificar posibles accesiones duplicadas, dado su perfil genético idéntico como: NATU08, NATU09, SABO03 y SABO01. El análisis de conglomerados y de estructura identificó tres grupos poblacionales altamente diferenciados, uno conformado por bananitos, y los otros dos por bananos de cultivares comerciales y bananos con características silvestres más las ornamentales. En conclusión, la colección presenta una alta diversidad genética distribuida principalmente en los bananos y ornamentales, y en menor medida en los bananitos; igualmente, se encuentra dividida en poblaciones discretas con una alta pertenencia y un escaso flujo genético.

Palabras clave: Diversidad genética, marcadores moleculares, Musáceas, simple sequence repeats, SSR.

Abstract

Banana (*Musa* spp.) its fundamental to the economy of developing countries, including our country. Because of this reasons, the characterization of musaceas genetic diversity is essential to the management and exploitation of its genetic resources. In the current study 99 accessions from the collection of *Musa* spp. that are part of the germplasm bank of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA, Palmira, Valle del Cauca), were evaluated by twelve fluorescent microsatellite molecular markers (SSR). A total of 206 alleles were identified, with a polymorphic information content (PIC) average of 0.106 and a marker index (IM) average of 1.377, indicating the presence of polymorphic and informative markers. The expected heterozygosity and number of alleles were superior in banana and ornamentals ($He=0.836-Na=14.1$ y $He=0.848-Na=8.5$, respectively), while bananitos presented inferior values ($He=0.569-Na=6.25$). The dissimilarity analysis allowed to identify possible duplicate accessions, given its identical genetic profile as: NATU08, NATU09, SABO03 y SABO01. Cluster and structure analysis identified three highly differentiated population groups, one formatted by bananitos, and the other two by banana of commercial cultivars and banana with wild characteristics plus ornamental ones. In conclusion, the collection presents a high genetic diversity mainly in the banana and ornamentals and in smaller amounts in bananitos; likewise, it is divided into discrete populations with high identity and low gene flow.

Key Word: Genetic diversity, molecular markers, Musaceas, simple sequence repeats, SSR.

Contenido

Pág.

Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XII
Introducción	1
1. Objetivos	3
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. Marco teórico	5
2.1 Generalidades de las Musáceas	5
2.1.1 Historia	5
2.1.2 Taxonomía, origen y distribución geográfica.....	5
2.1.3 Descripción botánica.....	6
2.1.4 Importancia económica.....	8
2.2 Análisis de la diversidad genética.....	10
2.2.1 . Marcadores genéticos.....	10
2.2.2 Marcadores microsatélites	11
2.2.3 Diversidad genética	12
2.2.4 Diversidad genética intrapoblacional.....	12
2.2.5 Estructura poblacional	14
2.2.6 Relaciones genéticas.....	15
3. Antecedentes	17
4. Materiales y métodos	20
4.1 Material genético.....	20
4.1.1 Extracción y purificación del ADN	20
4.1.2 Determinación de la calidad e integridad del ADN	21
4.2 Selección, estandarización y amplificación por PCR de los microsatélites	21

4.2.1	Selección preliminar de los microsatélites	21
4.2.2	Estandarización de los microsatélites	23
4.2.3	Condiciones para la amplificación de microsatélites	23
4.2.4	Diseño y optimización de PCR marcados con fluorescencia	23
4.3	Análisis de los datos obtenidos de los microsatélites	25
5.	Resultados y discusión	27
5.1	Concentración y pureza del ADN	27
5.2	Microsatélites	27
5.3	Diversidad intrapoblacional	29
5.4	Estructura genética	31
5.5	Distancia genética	34
5.6	Análisis de agrupamiento	36
6.	Conclusiones y recomendaciones	41
6.1	Conclusiones	41
6.2	Recomendaciones	42
A.	Anexo: Acciones de Musáceas	43
B.	Anexo: Calidad del ADN de Musáceas	47
	Bibliografía	50

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1. Distribución geográfica de las secciones del género <i>Musa</i>	7
Figura 2-2. Distribución geográfica de las especies y subespecies ancestrales del género <i>Musa</i>	7
Figura 2-3. Morfología de una planta de Musáceas.	9
Figura 5-1. A. Valores medios del logaritmo de la probabilidad de K (LnP (K)) para 10 corridas independientes para cada K. B. Valores de ΔK para cada función K basado en el método de Evanno <i>et al.</i> (2005).	31
Figura 5-2. Diagrama de barras para las poblaciones inferidas con el análisis bayesiano en las accesiones de <i>Musa</i> spp.....	32
Figura 5-3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia genética de Dice (1945) para 99 accesiones de <i>Musa</i> spp.	37
Figura 5-4. Dendrograma generado por el método de neighbor joining (Saitou & Nei, 1987) para el análisis de 99 accesiones de Musáceas.	39

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1. Buffer de extracción de ADN propuesto por Doyle (1991).....	21
Tabla 4-2. Microsatélites evaluados para la caracterización de banco de germoplasma de Musáceas.	22
Tabla 4-3. Coctel por reacción de PCR empleado para amplificar los doce microsatélites en Musáceas.....	24
Tabla 4-4. Microsatélites fluorescentes usados para el análisis de la diversidad genética de Musáceas.....	24
Tabla 4-5. Estimadores empleados para describir la diversidad genética intrapoblacional con microsatélites en Musáceas.	26
Tabla 5-1. Concentración y pureza del ADN de Musáceas.	27
Tabla 5-2. Estimadores usados para la caracterización de los microsatélites.	29
Tabla 5-3. Estimadores de diversidad genética para tipo y genoma de Musáceas.	30
Tabla 5-4. Agrupación por tipo de Musáceas basado en el dendograma usando el método de neighbor joining (Saitou & Nei, 1987).	38
Tabla 5-5. Parentales de híbridos de Musáceas.	40

Introducción

Los bananos, bananitos y plátanos, son unos de los principales cultivos del mundo y se siembran en todas las regiones tropicales (Denham *et al.* 2003). Su producción anual para el 2018 se estimó en 127 millones de toneladas (FAOSTAT, 2018). Son fundamentales para la economía de países en desarrollo y constituyen un alimento vital para la seguridad alimentaria de millones de personas. Dada la importancia socio económica de este cultivo, es primordial desarrollar proyectos que impacten positivamente sobre la calidad de vida de los productores.

La disponibilidad y conocimiento de los recursos genéticos disponibles de las Musáceas es un paso primordial para su aprovechamiento en beneficio de la comunidad bananera. Sin embargo, la adopción como cultivo, la amplia distribución geográfica y la variabilidad entre especies, ha conllevado a un movimiento acelerado del germoplasma, limitando la identificación de cada una de las accesiones e impidiendo conocer la diversidad poblacional. A consecuencia, se han afectado los programas de mejoramiento genético, imprescindibles para facilitar el manejo agronómico, mejorar la calidad y rendimiento de la fruta y contrarrestar los efectos negativos de las enfermedades, plagas y factores abióticos que amenazan la producción. Adicionalmente, la incapacidad de detectar duplicados de plantas en el banco de germoplasma que genera costos adicionales de mantenimiento.

La caracterización y evaluación de los recursos genéticos se ha convertido, por lo tanto, en una prioridad, en este sentido la FAO (1996) coordina a través de redes globales la investigación, para facilitar la conservación y aprovechamiento de las colecciones de Musáceas. En Colombia, la colección se encuentra ubicada en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) en Palmira y está conformada por 185 accesiones caracterizadas por métodos morfológicos, fisicoquímicos y agronómicos (Caicedo, 2015). Según Giraldo, *et al.* (2011), esta colección se destaca por ser la única a nivel mundial que posee introducciones andinas de altura (>1500 m.s.n.m.).

Numerosos marcadores y técnicas moleculares se han utilizado para caracterizar las especies de *Musa*, tales como: los SSR, RFLP, ISSR, RAPD y VNTR. Los microsatélites o SSR se han destacado por poseer el más alto grado de polimorfismo, son codominantes, reproducibles y fáciles de interpretar (Alcántara, 2007). Recientemente, Christelova *et al.* (2011), Hippolyte *et al.* (2012) y de Jesús *et al.* (2013) utilizaron microsatélites para estimar la diversidad genética, identificar faltantes en las colecciones, determinar el parentesco y reconocer errores de propagación en el germoplasma de los plátanos cultivados y silvestres (Irish *et al.* 2014).

El presente estudio caracterizó la diversidad genética de bananos y bananitos del banco de germoplasma de Agrosavia con marcadores moleculares utilizando la técnica de microsatélites de tipo fluorescente, con el objetivo de aprovechar los recursos genéticos para el desarrollo de posteriores estrategias que conlleven a la conservación, reproducción y mejoramiento genético de este recurso.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Caracterizar la diversidad genética de los bananos y bananitos de la colección de Musáceas de Agrosavia con microsatélites fluorescentes.

1.2 Objetivos específicos

Validar la técnica de microsatélites fluorescentes en la evaluación de la diversidad genética de bananos y bananitos.

Estimar la diversidad y distancias genéticas de las accesiones mediante el uso de marcadores moleculares.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de las Musáceas

2.1.1 Historia

Las prácticas de explotación de plantas en selvas tropicales llevaron a la aparición y dispersión de distintas formas de agricultura en varias regiones del mundo. El género *Musa*, según Langhe *et al.* (2009) es originaria del sudeste de Asia, específicamente en Nueva Guinea y se infiere que a mediados del Holoceno comenzó su dispersión iniciándose en el este de Indonesia y que actualmente la distribución natural de las Musáceas se extiende desde el norte con Nepal y el sur de la China montañosa hasta las islas de Indonesia y Nueva Guinea, el límite occidental es India y al este, se registraron *Musa* salvajes en Melanesia (Figura 1-1). Además, el banano ha sido introducido en regiones tropicales y subtropicales, incluyendo Colombia, donde son fundamentales para la subsistencia de granjeros (Arteaga, 2015).

El banano tipo exportación fue introducido en Colombia en 1887 “después de la construcción de la red ferroviaria entre Santa Marta y Ciénaga”, pertenecían a la variedad Gros Michel y habían sido traídas de Bocas del Toro, Panamá. Desde entonces comenzó a ser un cultivo promisorio por la elevada producción (Brungardt, 1987) y actualmente es el tercer producto en la lista de exportación después del café y las flores (ASBAMA, 2016).

2.1.2 Taxonomía, origen y distribución geográfica

Los bananos, bananitos y plátanos se derivan de las especies *Musa acuminata*, *Musa balbisiana* y sus cruces interespecíficos. Las musáceas pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, al orden Zingiberales, familia Musaceae. El género *Musa* se divide en

cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Eumusa, esta última comprende las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Arteaga, 2015).

El género *Musa* se ha clasificado en cuatro secciones, Eumusa ($2x=22$) cubriendo toda el área de diversidad primaria, excepto Melanesia oriental, Rhodochlamys ($2x=22$) en el sudeste de Asia, Australimusa ($2x=20$) del sureste de Indonesia y el sur de Filipinas y Callimusa ($2x=20$) principalmente el sur de Vietnam, Malasia peninsular, Borneo y Sumatra (Figura 2-1).

En la sección de Eumusa están contenidas *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. Según Langhe *et al.* (2009) los ancestros de la primera especie se distribuían en casi todo el sudeste de Asia, excepto la periferia (norte de Vietnam y Laos), en donde se encontraba confinada principalmente la segunda (Figura 2-2).

Las especies de banano y plátano comestibles se originaron, según Bakry *et al.* (1997), de los cruces intra e interespecíficos de *Musa balbisiana* Colla (Genoma B) y *Musa acuminata* Colla (Genoma A), estas solas o en combinación son las especies progenitoras de la mayoría de bananos cultivados, que pueden ser diploides ($2n = 22$, AA, BB y AB), triploides ($3n = 33$, AAA, ABB y AAB) o tetraploides ($4n = 44$, AABB, AAAB, ABBB y AAAA). Para las Musáceas las plantas poliploides son más resistentes, vigorosas, de mayor adaptación y productividad que las diploides.

2.1.3 Descripción botánica

Las plantas de banano son herbáceas perennes gigantes, comúnmente con una altura de más de tres metros. El tallo verdadero se encuentra bajo tierra, generalmente se le conoce como corno pero el término botánico correcto es rizoma, de este se originan los pseudotallos que están conformados por un conjunto de vainas foliares superpuestas (Figura 2-3), es muy carnoso, y aunque está formado principalmente por agua puede soportar un racimo de 50 kg o más (ProMusa, 2016).

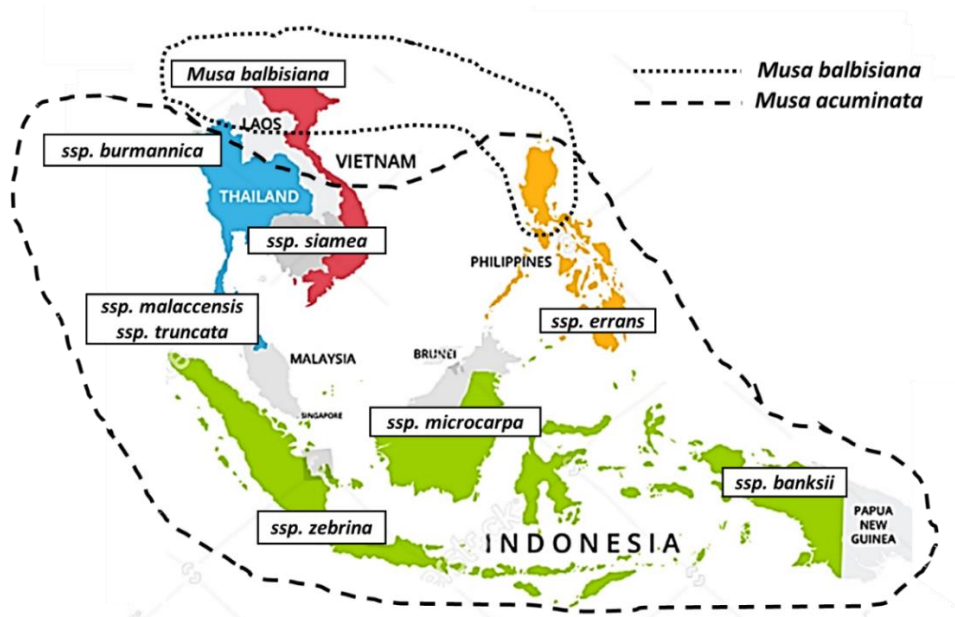
El hijuelo es un brote lateral que se desarrolla desde el rizoma y surge muy cerca de la planta progenitora, se le conoce como retoño, vástago, brote o colino. No todos se desarrollan como una planta vigorosa, el hijo seleccionado para reemplazar a la planta madre después de la fructificación se le denomina sucesor (ProMusa, 2016).

Figura 2-1. Distribución geográfica de las secciones del género *Musa*.



Fuente: Simmonds, 1962.

Figura 2-2. Distribución geográfica de las especies y subespecies ancestrales del género *Musa*.



Fuente: Langhe et al. 2009.

Las hojas tienen una distribución helicoidal, lisas, oblongas y las nervaduras pinnadas, dispuestas en espiral, se despliegan hasta alcanzar 2m de largo y hasta 90 cm de ancho; el peciolo tiene hasta 60 cm (Isneider, 2016).

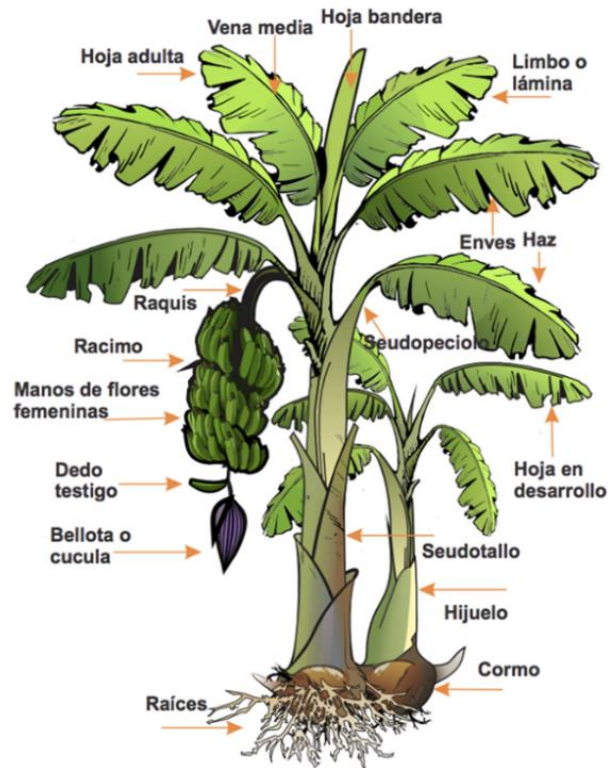
Las plantas de banano presentan un sistema radicular primario y uno adventicio (ProMusa, 2016), son superficiales y se distribuyen en una capa de 30 a 40 cm de profundidad con un diámetro aproximado entre 5 y 8 mm, de tipo fibroso (Ortiz *et al.* 2001; Isneider, 2016).

Los bananos son plantas monoicas, las flores femeninas (pistiladas) aparecen primero, el ovario se desarrolla en un fruto sin semillas, mediante partenocarpia. A medida que las flores femeninas se desarrollan en frutos, la porción distal de la inflorescencia se alarga y produce grupo de flores masculinas (estaminadas), cada uno bajo una bráctea, producen polen, pero pueden ser o no estériles. Las flores hermafroditas pueden presentarse en el raquis, por lo general no se desarrollan como frutos y sus estambres no producen polen (ProMusa, 2016).

El fruto de banano se caracteriza por ser una baya epígina de piel gruesa con abundante colénquima y finalmente resulta en una masa parenquimatosa de hasta 23 cm que contiene una gran cantidad de azúcares, almidón, potasio, calcio, vitamina A, entre otros (Ortiz *et al.* 2001). El bananito también pertenece al género *Musa*, sin embargo su fruto se caracteriza por tener un sabor ligeramente más dulce, con un tamaño que fluctúa entre los 10 y 12 cm de longitud y un peso entre los 60 y 80 gramos (Isneider, 2016).

2.1.4 Importancia económica

El banano (*Musa* spp.) es cultivado en todas las regiones tropicales alrededor del mundo, por su valor nutricional se considera el cuarto cultivo de mayor importancia después del trigo, el maíz y el arroz, es la fruta fresca más exportada del mundo en cuanto a valor y volumen, proporciona empleo e ingresos y aporta a la seguridad alimentaria de millones de personas. Además, de la trascendencia como alimento humano, también tiene múltiples potencialidades como alimento animal, fuente de fibras, compuestos naturales, biopolímeros, alcohol y azúcares (Lacuna & Richman, 2002). Igualmente, es usado como cultivo asociado, refugio de fauna silvestre y su genoma es utilizado en el estudio de virus (Arias *et al.* 2004).

Figura 2-3. Morfología de una planta de Musáceas.

Fuente: Infoagronomo, 2018.

La producción del año 2017 según la FAOSTAT señala como el país de mayor producción de banano del mundo a la India con 26%; seguido de China con 10%, Indonesia con 6.3%, Brasil con 5.8%, Ecuador con 5.5% y Filipinas con 5.3%. En cuanto a Colombia, junto con otros países como Angola, Guatemala, Tanzania, Costa Rica y México, producen entre 2 y 3%.

En Colombia el banano es uno de los principales cultivos agrícolas y “las zonas donde más se cultiva son los departamentos de Antioquia (región de Urabá) y Magdalena medio” (Ospina *et al.* 2018), como cultivo asociado se encuentra en todo el territorio nacional. La producción de banano para exportación, dependía inicialmente del cultivo de Gros Michel, pero por la susceptibilidad al Mal de Panamá, fue reemplazado por clones de Valery, Gran Enano, Giant Cavendish y Williams (Giraldo & Montoya, 2012).

Para el año 2018 en el territorio nacional se registraron 133.031 hectáreas de las cuales 83.724 fueron de consumo interno y 49.307 de banano tipo exportación (Ministerio de Agricultura, 2018) y de acuerdo a la Asociación de Bananeros de Colombia (2018) producen 1.980.000 toneladas que corresponde a USD 846 millones, posesionando a este cultivo en el tercer lugar dentro de un listado de exportación de productos agrícolas, el cual es liderado por la exportación de café y flores.

En cuanto al bananito, en Colombia se reportan 4992 hectáreas sembradas para el 2018 concentradas en los departamentos de Nariño, Choco y Tolima obteniéndose un crecimiento del 104% frente al año 2017. Hace parte de las frutas exóticas de mayor impacto en las exportaciones después de la granadilla, las principales variedades que se comercializan son el Orito, Manzano, Niño, Burro y Red (Ministerio de Agricultura, 2017).

2.2 Análisis de la diversidad genética

2.2.1 . Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos permiten evidenciar variación, se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana, establecen diferencias entre dos individuos que pueden o no pertenecer a la misma especie (Gonzalez, 2008). Las características de estos los han hecho técnicas útiles “para la identificación de especies, cepas, híbridos, análisis de diversidad, recursos genéticos, determinación de paternidad, mapeo genómico con aplicación a genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular, genética de la conservación”, entre otros (Gonzalez, 2008; Hopp & Hopp, 2014).

Los marcadores genéticos se pueden clasificar en tres tipos: marcadores morfológicos, en donde los polimorfismos de los genes se detectan por medio de su fenotipo, bioquímicos que incluyen perfiles electromagnéticos de isoenzimas y proteínas de reserva y los moleculares que revelan sitios de variación a nivel del ADN (Hopp & Hopp, 2014). Las principales desventajas de los marcadores bioquímicos y morfológicos es que están limitados en número y son influenciados por los factores ambientales o de la etapa de desarrollo de la planta a diferencia de los moleculares (Gonzalez, 2008).

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que pueden detectarse fácilmente dentro del genoma de un organismo, trabajan directamente con la base genética de

variación y permiten seleccionar y definir los caracteres de una manera relativamente objetiva (Alcántara, 2007; Rocha, 2003). Estos son fundamentales en diversos campos de la biología como: evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad, además se utilizan para localizar y aislar genes de interés, la introgresión de genes a través de retrocruzamientos, caracterización del germoplasma, diagnóstico genético, estudio de la organización del genoma y filogenética (Gonzalez, 2008).

Los diferentes tipos de marcadores moleculares se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples. Los primeros tienen la ventaja de determinar el genotipo exacto de un individuo al detectar todas las variantes alélicas presentes en un locus particular de sus cromosomas homólogos. Los segundos no permiten conocer el genotipo exacto de un individuo (solo permiten detectar una variante alélica por locus en cada individuo) pero tienen la ventaja de analizar simultáneamente la variación en varias regiones del genoma (Alcántara, 2007).

Estos marcadores pueden ser agrupados, en tres categorías según una de las técnicas de la biología molecular empleadas en su análisis, tales son: las que aplican hibridación del ADN como los RFLPs (Fragmentos de Restricción Polimórficos) y los VNT (Minisatélites), los que utilizan la amplificación de fragmentos por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como los RAPD (Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar), los AFLPs (Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados) y los SSR (Microsatélites) y los marcadores basados en la secuenciación de fragmentos como los SNPs (Polimorfismo de Nucleótido Único)(Rocha, 2003).

2.2.2 Marcadores microsatélites

Los microsatélites, SSR (Simple Sequence Repeats) o STR (Short Tandem Repeats) son regiones de ADN caracterizadas por presentar repeticiones en tándem de patrones muy cortos de pares de bases (1 a 6), son codominantes, presentan un alto polimorfismo por locus y debido a que el número de repeticiones es altamente variable entre los individuos y poblaciones, son efectivos para fines de caracterización. Son fundamentales en el área de la biología en estudios de plantas y animales, también han sido usados ampliamente en el campo de la agricultura, donde se utilizan para caracterizar materiales genéticos, selección de plantas, construcción de mapas de ligamiento densos, mapeo de loci de

caracteres cuantitativos (QTLs) económicamente importantes y en programas de mejoramiento (Gonzalez, 2008; Madesis *et al.* 2013).

La identificación de los polimorfismos se hace por medio de cebadores contruidos específicamente para la amplificación, mediante PCR, de la región de ADN que es flanqueada por el microsatélite. Los microsatélites son un tipo de marcador versátil en los métodos de detección, pueden visualizarse y registrarse con geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata, con análisis de fragmentos fluorescentes en secuenciador automático o incluso con secuenciación de última generación (Trochez *et al.* 2019).

2.2.3 Diversidad genética

La diversidad genética se refiere al conjunto de toda la variación de tipo hereditario dentro de la especie. Esta variación es esencial para el funcionamiento de los ecosistemas, al hacer posible que las poblaciones se adapten a condiciones cambiantes del medio ambiente (De Vicente *et al.* 2004), representada en individuos con características potenciales, tolerancia y/o resistencias a sequias, inviernos, plagas y enfermedades específicas. Es fundamental para los programas de mejoramiento genético la generación de nuevos híbridos u organismos genéticamente modificados que se adapten y sean capaces de tener una buena producción bajo condiciones adversas. Por lo anteriormente expuesto su estudio es de vital importancia en el área agrícola y pecuaria (Cruz *et al.* 2014).

El análisis de la diversidad genética con marcadores moleculares comprende tres pasos: describir la diversidad intrapoblacional, analizar la estructura poblacional y las relaciones genéticas.

2.2.4 Diversidad genética intrapoblacional

La descripción de la diversidad intrapoblacional se revela mediante diversos índices de cuantificación, entre los principales están el contenido de información polimórfica (PIC), la tasa de polimorfismo (Pj), el número promedio de alelos por locus (NPA) y el índice de marcador (MI).

▪ **Contenido de información polimórfica (PIC)**

El contenido de información polimórfica hace referencia al valor de un marcador para detectar polimorfismo dentro de una población, dependiendo del número de alelos detectables y la distribución de su frecuencia; por lo tanto, proporciona una estimación del poder de discriminación del marcador (Nagy *et al.* 2012). La ecuación 1.1 indica cómo se puede calcular el valor PIC para cada locus.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^K p_i^2 - \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=i+1}^K 2p_i^2 p_j^2 \quad (1.1)$$

Donde p_i = frecuencia del i -ésimo alelo en un locus y K = número de loci.

Estudios realizados por De Jesus *et al.*, (2013) donde se evaluó un grupo de Musáceas con microsatélites, por la complejidad del análisis por el nivel de ploidía de las introducciones convirtieron la matriz en un formato binario y usaron la siguiente fórmula para estimar los valores del PIC (Ver ecuación 1.2).

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i) \quad (1.2)$$

En donde, i es la información del i -ésimo marcador, f_i es la frecuencia del alelo amplificado (presencia de una banda) y $1 - f_i$ es la frecuencia de los alelos que no están presentes.

▪ **Tasa de polimorfismo (Pj)**

El polimorfismo se refiere a la coexistencia de patrones alternos de bandas o variantes de ADN que se evidencian mediante métodos de detección. Un locus se define como polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 o 0.99 (Ver ecuación 1.3).

$$P_j = q \leq 0.95 \quad \text{ó} \quad P_j = q \leq 0.99 \quad (1.3)$$

Donde P_j es la tasa de polimorfismo y q es la frecuencia alélica.

Esta medida proporciona el criterio para definir si un gen presenta variación (IPGRI *et al.* 2004).

- **Índice de marcador (IM)**

El índice de marcador proporciona una estimación de la utilidad de los marcadores, que es determinado por el nivel de polimorfismo detectado y la medida en que se pueden identificar múltiples polimorfismos (Ver ecuación 1.4).

$$IM = PIC \times EMR \dots\dots\dots (1.4)$$

Es decir, un producto del contenido de información polimórfica o PIC y la relación de multiplexación efectiva o EMR (Rajeev *et al.* 2007).

- **Número promedio de alelos por locus (NPA)**

Es la suma de todos los “n” alelos detectados en todos los “i” loci, dividido por el número total de “K” loci (IPGRI *et al.* 2004). La ecuación 1.5 indica el caculo del número promedio de alelos por locus.

$$NPA = (1/K) \sum_{i=1}^K n_i \dots\dots\dots (1.5)$$

2.2.5 Estructura poblacional

La asignación de los individuos a poblaciones es fundamental para comprender un posible escenario de la estructura genética, convirtiéndose en un paso esencial para los programas de genética evolutiva, ecología molecular, entre otros. En efecto, cuando se desconoce completamente el origen y sitios de muestreo de los individuos analizados, se requiere de programas que proporcionen el número más probable de poblaciones (K) y la pertenencia de los individuos a esas poblaciones (Q). Para tal propósito se han desarrollado muchos programas, entre los cuales el más utilizado es STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2016).

Este software ofrece un análisis de un grupo, generalmente como una matriz Q_{ik} que contiene para cada individuo *i* los coeficientes de pertenencia de ese individuo en cada uno de los grupos *k*. Estos coeficientes se pueden interpretar como probabilidades de pertenencia o como la fracción del genoma con pertenencia al grupo *K* (Kopelman *et al.* 2009).

2.2.6 Relaciones genéticas

Existen varios métodos multivariados que facilitan la interpretación de las relaciones genéticas obtenidas de la matriz de distancia generando representaciones gráficas, como lo son el análisis de agrupamiento y de componentes principales (PCA), entre otros.

El análisis de componentes principales (PCA) es un análisis estadístico multivariante utilizado en genética de poblaciones para reducir el número de variables asignadas a cada población y/o especie, ajustando los resultados a dos o tres dimensiones y logrando diagramas de dispersión de puntos para determinar las relaciones genéticas en el espacio de los individuos, las poblaciones y/o especies estudiadas (Gonzalez, 2008).

El análisis de agrupamiento o de conglomerados es una técnica que permite ordenar individuos en grupos generando dendogramas basados en distancias, es decir, utilizan el alineamiento o diferenciación genética para calcular las distancias entre UBCs (Unidad básica de caracterización) y posteriormente tratan de reconstruir un árbol a partir de dichas distancias (Núñez & Escobedo, 2011).

Los algoritmos o métodos de reconstrucción filogenética más comunes son el UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means, UPGMA) y el Neighbor joining. El primero es el método más sencillo de todos, toma la distancia promedio de todos los pares, entre los individuos de la muestra, mientras que el Neighbor joining o ligamiento simple toma la distancia del vecino con el que presenta mayor similitud (Gonzalez, 2008).

En el caso de la filogenia molecular los datos son normalmente secuencias de genes o proteínas en forma de un alineamiento múltiple y es común el empleo de métodos de agrupamiento adicionales a los basados exclusivamente en distancias genéticas. Las metodologías utilizadas para la estimación de árboles evolutivos se dividen en cuatro categorías: matriz de distancias, parsimonia, invariantes y máxima probabilidad (Swofford y Olsen, 1990). Los resultados del análisis de conglomerados pueden aportar a la clasificación e identificación formal de individuos como por ejemplo una taxonomía, o a sugerir análisis estadísticos posteriores para la descripción de poblaciones, asignar individuos nuevos a un grupo, entre otros (Villardón, n.d.)

3. Antecedentes

Inicialmente, los procesos de mejoramiento en banano empezaron con la evaluación y obtención de materiales resistentes al hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense, agente causal del Mal de Panamá, principal limitante del cultivo. La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, FHIA, fue la encargada del mejoramiento genético del cultivo para producir híbridos resistentes al hongo, como los de Gros Michel, sin embargo, no resultaron tan productivos como los clones Cavendish, mayormente utilizados para las plantaciones comerciales desde 1960.

El mejoramiento genético convencional no se ha podido usar para desarrollar un nuevo híbrido a partir de los clones Cavendish, debido a la esterilidad femenina reportada inicialmente por Simmonds (1962) y verificada por otros estudios realizados por Stover y Buddenhagen (1986) y Stover y Simmons (1987). El desarrollo de materiales mejorados con características agronómicas adecuadas de producción y resistencia a enfermedades es el principal objetivo de los programas de mejoramiento, por ende a nivel mundial se realizan caracterizaciones morfológicas, físicas, químicas y moleculares de individuos que puedan aportar a la creación de nuevos híbridos (Fundacion Hondureña de Investigacion Agricola, n.d.).

La colección de musáceas de Agrosavia (Corporación Colombiana de Investigación Agrícola) ha sido caracterizada por diferentes métodos. Álvaro Caicedo (2015) realizó la caracterización morfológica, física y química de 185 accesiones y concluyó que existe alta variabilidad genética entre tipos y genomas, sin embargo, para el caso de los bananitos la diversidad es limitada y se hace énfasis en la necesidad de un estudio posterior a nivel molecular que permita una utilización más eficiente de los recursos del banco. Adicionalmente, se cuenta con diversas accesiones con características promisorias de

porcentaje de grados Brix, materia seca y almidón que pueden ser usadas en programas de mejoramiento.

A nivel general el genoma de las musáceas se ha caracterizado mediante varias técnicas, como: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), VNTR (Variable Number Tandem Repeats), DArT (Diversity Arrays Technology) y SSR (Manzo *et al.* 2015).

Los marcadores RFLP son una técnica descrita por Botstein *et al.* (1980), se han usado ampliamente para detectar polimorfismos de fragmentos de ADN, basándose en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción (Becerra & Paredes, 2000). Según Manzo *et al.* (2015) este tipo de marcador ha sido útil en *Musa* para construir mapas de vinculación genética, análisis filogenético y de variación del genoma del cloroplasto. Además, permitió detectar variaciones genéticas de *M. balbisiana* salvaje en la India asociadas con la caracterización morfológica y taxonómica. Sin embargo, falla en algunos grupos específicos, por ello se requiere del estudio adicional con otros marcadores.

Los RAPD desarrollados por Williams *et al.* (1990) basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifican regiones de un genoma individual e identifica polimorfismos más precisos al detectar pequeños cambios en los nucleótidos. El primero en publicar el uso de la técnica en *Musa* fue Kaemmer (1992) para la identificación de individuos “fingerprinting” en varios cultivares. Desde entonces se han usado principalmente con ese objetivo y para la clasificación de germoplasma, y aunque actualmente se siguen publicando investigaciones probablemente por su bajo costo, la obtención rápida de resultados y la baja cantidad de ADN requerida, sus resultados son cuestionados por la inconsistencia en los datos, dado que la alteración más pequeña en los parámetros de amplificación pueden cambiar los resultados (Becerra & Paredes, 2000; Manzo *et al.* 2015).

Los ISSR y los RAPD determinaron la estabilidad genética de tres cultivares de banano (*Musa* spp.) indicando que se detectó mayor polimorfismo con los primeros comparados con los segundos, según lo referido por Manzo *et al.* (2015). En este contexto los ISSR se utilizaron para detectar la uniformidad genética; en otros estudios señalados por el mismo autor también se han implementado para evaluar la diversidad genética de introducciones de banano silvestre recolectadas en China e India encontrando diversos orígenes y caminos evolutivos.

Los VNTR son regiones cortas de ADN repetidos en tándem (1 a 4 pb) y se generan por amplificación por PCR altamente específica. Las investigaciones realizadas con este tipo de marcador han demostrado detectar alto nivel de polimorfismo entre individuos de poblaciones de *Musa* y descubrieron nuevos loci en *M. acuminata* (Manzo *et al.* 2015).

DArT es una tecnología de genotipado basada en la hibridación del ADN, que permite la creación de perfiles de genoma completo a bajo costo, sin información previa de la secuencia. Los estudios con este marcador han desarrollado aproximadamente 1500 marcadores usando una amplia gama de introducciones de *Musa* spp., ayudando a resolver el pedigrí de genotipos valiosos de origen desconocido y el análisis de relación entre diversas constituciones de ploidía (Manzo *et al.* 2015).

4. Materiales y métodos

4.1 Material genético

Un total de 99 accesiones, de las cuales 93 pertenecen a la especie *Musa acuminata*. De estas, 55 corresponden a banano y 38 a bananito. Adicionalmente se evaluaron 6 ornamentales de las especies *M. textilis*, *M. velutina*, *M. basjoo*, *M. ornata*, *M. laterita* y *M. itinerans* (Anexo A), que hacen parte del banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) ubicado en Palmira, Valle del Cauca, en coordenadas 3°52'12"N – 76°30'70"O, a una altura de 1100 msnm, con una temperatura promedio de 23°C y 1100 mm de precipitación.

4.1.1 Extracción y purificación del ADN

Muestras de la hoja bandera de cada accesión fueron recolectadas, posteriormente estas se pulverizaron con nitrógeno líquido para romper la pared celular y facilitar la extracción. El tejido pulverizado fue transferido a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. Seguidamente, el ADN fue extraído usando el protocolo propuesto por Doyle (1991), el cual comprende los pasos: incubación del buffer de extracción a 60°C por 30 minutos. Adición de 700 µL de buffer de extracción (tabla 4-1) al tejido pulverizado y homogenización de la mezcla con vortex. Incubación a 60°C por 30 minutos con agitación cada 5 minutos. Adición de 300 µL de alcohol isoamílico, 500 µL de cloroformo y mezclado con agitación usando el "shaker". Centrifugación a 13.000 rpm por 10 minutos. Transferencia del sobrenadante a un nuevo tubo previamente marcado. Adición de 2/3 del volumen de Isopropanol y mezclado con el agitador "shaker". Incubación a -20°C por 2 horas para la precipitación de los ácidos nucleicos. Centrifugación a 13.000 rpm por 10 minutos; remoción del isopropanol. Eliminación del sobrenadante y secado del precipitado a temperatura ambiente por 1 hora. Suspensión del pellet de ácidos nucleicos en 1ml de TE (10 mM Tris –Ha, 1mM EDTA, pH

7.4). Adición de 1 μ L de ARNasa e incubación a 37°C por 30 minutos. Dilución de la muestra con agua destilada. Adición de acetato de amonio (7.5M stock, pH 7.7) para obtener una concentración final de 2.5M, adición de etanol, incorporación suavemente para precipitación del ADN. Centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente por 40 minutos, eliminando bien el alcohol. Suspensión en TE y conservación a -20°C.

Tabla 4-1. Buffer de extracción de ADN propuesto por Doyle (1991).

Reactivo	Concentración final	Volumen*
Agua	-	32.5 ml
Tris 1M	100mM	5 ml
NaCl 5M	1.4M	14 ml
EDTA 0,5M pH 8	20mM	2 ml
CTAB	3%	1.5 g
B-Mercaptoetanol	0.2%	10 μ L
PVP	1%	0.5 g

*Volumen total del buffer: 50ml.

4.1.2 Determinación de la calidad e integridad del ADN

La concentración de las muestras de ADN fue cuantificada con el espectrofotómetro colibrí en nanogramos por microlitro ($\text{ng}/\mu\text{L}$) basado en el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm, simultáneamente, la pureza fue establecida con las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. El tamaño molecular del ADN fue identificado en un gel de agarosa (1.5%) con tinción de Gel Red y determinado con un transiluminador de UV. El almacenamiento de las muestras se hizo en un congelador a -20°C para su conservación durante la ejecución del proyecto.

4.2 Selección, estandarización y amplificación por PCR de los microsatélites

4.2.1 Selección preliminar de los microsatélites

Diecinueve microsatélites fueron seleccionados (Tabla 4-2) con base a los estudios realizados en Musáceas por Ashikin *et al.* 2012, Creste *et al.* 2006, Hippolyte *et al.* 2012, Kaemmer *et al.* 1997 y Nunes de Jesus *et al.* 2013. Los microsatélites fueron seleccionados

considerando criterios como: el contenido de información polimórfica (PIC), número de alelos (Na) y heterocigosidad (He).

Tabla 4-2. Microsatélites evaluados para la caracterización de banco de germoplasma de Musáceas.

Nombre	Rango	Secuencia (5'- 3')	Motivo	Ta (°C)	PIC	Na	He	Fuente
Mb163	180-200	F: AATGGCTGCCTGCCATGCA R: GAATCAAAGAGGGCAGAAGACGA	(GA)20	62	0.28	4	0.13	Crouch <i>et al.</i> (1998)
Mb169	370-390	F: CTGCCTCTCCTTCTCCTTGGAA R: TCGGTGATGGCTCTGACTCA	(TC)15	62	0.77	9	0.59	Crouch <i>et al.</i> (1998)
MaOCEN17	150-190	F: CGTTCTGCCTTGTCTTCTGT R: TGGGTTGACTCCTTTTGTGG	(TC)15	62	0.68	19	0.9	Creste <i>et al.</i> (2006)
Mb1134	380-210	F: ATGCCCAAGAAGGGAAGGGAA R: TAATGCCGGAGGATCAGTGTGA	(GA)21	62	0.52	18	0.9	Crouch <i>et al.</i> (1998)
MaOCEN04	130-180	F: GCCGAGAGAGGAAATGGAA R: CTGCGAGGGTAGAGTGGATG	(AG)20	62	0.65	19	0.78	Creste <i>et al.</i> (2006)
MaOCEN08	240-270	F: ATCAGCAACACAGGAAGAAAAG R: AATCTGGACGAGGGAGCA	(GA)16	62	0.62	21	0.93	Creste <i>et al.</i> (2006)
MaOCEN13	141-200	F: GCTGCTATTTTGCCTTGGTG R: CTTGATGCTGGGATTCTGG	(TC)16	62	0.72	14	0.68	Creste <i>et al.</i> (2006)
Mb1113	380-410	F: AGGTGCCACACAGTTCAGACA R: CAACCCAAACCTGTTCCGACCAA	(GA)18	62	0.3	15	0.79	Crouch <i>et al.</i> (1998)
MaOCEN01	210-250	F: TCTCAGGAAGGGCAACAATC R: GGACCAAAGGGAAAGAAACC	(CT)17	62	0.68	11	0.46	Creste <i>et al.</i> (2006)
mMaCIR01	220-294	F: TTAAGGTGTAGCATTAGG R: TTTGATGTCACAATGGTGTCC	(GA)20	55	0.97	24	0.91	Lagoda <i>et al.</i> (1998)
mMaCIR264	214-331	F: AGGAGTGGGAGCCTATTT R: CTCCTCGGTCAGTCCTC	(CT)17	60	0.9	17	0.61	Lagoda <i>et al.</i> (1998)
mMaCIR13	246-286	F: TCCCAACCCTGCAACCACT R: CCCTTTGCGTGCCCTAA	(GA)16N76(GA)8	53	0.89	19	0.89	Lagoda <i>et al.</i> (1998)
mMaCIR40	150-189	F: GGCAGCAACAACATACTACGAC R: CTACTTCACCCCACTTTTA	(GA)13	54	0.91	16	0.53	Lagoda <i>et al.</i> (1998)
mMaCIR07	121-169	F: AACAACTAGGATGGTAATGTGTGGAA R: GATCTGAGGATGGTCTGTGGAGTG	(GA)13	53	0.88	21	0.55	Lagoda <i>et al.</i> (1998)
mMaCIR08	231-251	F: ACTTATTCCTCCGCACTCAA R: ACTCTCGCCATCTTCATCC	(TC)6N24(TC)7	55	0.74	12	0.83	Lagoda <i>et al.</i> (1998)
MMACIR39	300-380	F: AACACCGTACAGGAGTCAC R: GATACATAAGGCAGTCACATTG	(CA)5GATA(GA)5	52	0.71	20	0.89	Lagoda <i>et al.</i> (1998)
MMACIR150	200-650	F: ATGCTGTCATTGCCTTGT R: ATGACCTGTGCAACATCCT	(CA)10	54	0.79	17	0.52	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)
Ma-1-132	330-378	F: GGAAAACGCGAATGTGTG R: AGCCATATACCGAGCACTTG		55	0.98	10	0.51	Kaemmer <i>et al.</i> (1997)
Ma-3-139	114-141	F: ACTGCTGCTCTCCACCTCAAC R: GTCCCCAAGAACCATATGATT	(GA)14	56	0.97	6	0.62	Crouch <i>et al.</i> (1998)

Ta: Temperatura de alineación; PIC: contenido de información polimórfica; Na: número de alelos; He: Heterocigosidad esperada.

4.2.2 Estandarización de los microsatélites

Los diecinueve microsatélites seleccionados se llevaron a un proceso de verificación con cinco accesiones de la población tomadas al azar, en las cuales fue realizada la respectiva PCR para una correcta amplificación del ADN. Doce microsatélites (Mb163, Mb169, MaOCEN17, Mb1134, MaOCEN04, MaOCEN08, MaOCEN013, Mb1113, MaOCEN01, mMACIR39, mMACIR264 y mMACIR08) amplificaron exitosamente y fueron seleccionados para el análisis del total de accesiones de Musáceas.

4.2.3 Condiciones para la amplificación de microsatélites

Los doce microsatélites fueron amplificados por PCR en un volumen final de 20 μ l (tabla 4-3) con las siguientes condiciones: iniciación a 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 62°C por 45 seg, 72°C por 1 min, seguido de 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 48-62°C por 45 seg y extensión a 72°C por 1 min y la extensión final a 72°C por 10 min.

La confirmación de la amplificación de los microsatélites fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (1,5 g agarosa + 100 ml TBE 0,5 X, 120 V por 45 min) con tinción de Gel Red y registrado con un transiluminador UV.

4.2.4 Diseño y optimización de PCR marcados con fluorescencia

Doce microsatélites fueron ordenados en cuatro paneles de tres marcadores cada uno, el cebador forward de cada uno de los microsatélites en un mismo panel fue marcado con un fluorocromo de diferente color para permitir la diferenciación de los fragmentos de ADN (tabla 4-4).

Los productos de PCR de cada accesión fueron mezclados de acuerdo a los paneles y de cada mezcla se tomó una alícuota de 1.5 μ l que se colocó en un pozo específico de una placa de 96. La accesión y los microsatélites de cada pozo fueron registrados y la placa fue enviada para análisis de fragmentos fluorescentes en secuenciador automático al "Institute of biotechnology the Cornell University, New York, USA" para detectar y determinar de forma precisa el tamaño de los amplicones.

Tabla 4-3. Coctel por reacción de PCR empleado para amplificar los doce microsatélites en Musáceas.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µl)*
Agua estéril	-		7.8
dNTPs	25mM	4.3mM	3.48
MgCl ₂	25mM	2mM	1.6
Taq Buffer	10x	1.08x	2.16
BSA	5x	0.2x	0.8
Trehalosa	10%	0.8%	1.6
Taq polimerasa	5u/µl	0.04u/µl	0.16
Primer F	10mM	0.1mM-0.48mM	0.2-0.96
Primer R	10mM	0.1-0.48mM	0.2-0.96
ADN	25-30ng/µl	2.5-3ng/µl	2

*Volumen total del coctel: 20 µl

Tabla 4-4. Microsatélites fluorescentes usados para el análisis de la diversidad genética de Musáceas.

Panel	Microsatélite	Diana fluorescente	Color emisión
1	Mb163	FAM	AZUL
	Mb169	PET	ROJO
	MaOCEN17	VIC	VERDE
2	Mb1134	PET	ROJO
	MaOCEN04	VIC	VERDE
	MaOCEN08	FAM	AZUL
3	MaOCEN13	PET	ROJO
	Mb1113	VIC	VERDE
	MaOCEN01	NED	AMARILLO
4	MMACIR39	VIC	VERDE
	mMaCIR264	PET	ROJO
	mMaCIR08	FAM	AZUL

Las lecturas del equipo fueron analizadas y transformadas en una matriz con los genotipos de las accesiones para los doce microsatélites mediante el software Geneious v7.0 (Kearse *et al.* 2012). Los datos alélicos obtenidos a partir del software fueron transformados en una matriz binaria de presencia/ausencia con la que se efectuaron los posteriores análisis.

4.3 Análisis de los datos obtenidos de los microsatélites

Los microsatélites fueron evaluados calculando los siguientes estimadores: número de alelos (N_a), número de alelos promedio por locus, contenido de información polimórfica (PIC), rango de tamaño, y el índice de marcador (IM) usando las fórmulas propuestas por Nunes de Jesús (2013) para Musáceas (Tabla 4-5). Los datos fueron obtenidos por medio del programa GenAlEx v. 6.5 (Smouse & Peakall, 2006). El análisis de la diversidad genética intrapoblacional se efectuó mediante el cálculo de la heterocigosidad observada y esperada, su determinación se hizo manual por la complejidad del nivel de ploidía del género *Musa*.

La asignación de las accesiones a poblaciones se realizó implementando el software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2016). El archivo de entrada para la corrida del programa fue una matriz binaria, donde se usó un periodo de 30.000 interacciones, seguido de una cadena de Markov Monte Carlo (Monte Carlo Markov Chain – MCMC) de 30.000, variando desde $K=2$ hasta $K=15$ poblaciones, con 10 corridas independientes para cada K . Se usó el modelo de ancestría mezclada y el de frecuencias alélicas correlacionadas.

La elección del número más probable de poblaciones se realizó con base en el valor logarítmico más alto de la probabilidad $\ln P(K)$ y utilizando el método de Evanno *et al.* (2005) basado en la tasa de cambio en la probabilidad logarítmica de los datos [$\ln Pr(X/K)$]. Para ello se utilizó el software Clumpak (Kopelman *et al.* 2009).

El análisis de las relaciones entre poblaciones se efectuó a partir de una matriz binaria de los alelos presentes. Se calculó el índice de disimilaridad de Dice (1945) con el que se generó un dendograma basado en el método Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) y un gráfico de dispersión en 2D fundamentado en el análisis de coordenadas principales (PCoA). Estos análisis fueron estimados con el software DARwin6 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006).

Tabla 4-5. Estimadores empleados para describir la diversidad genética intrapoblacional con microsatélites en Musáceas.

Estimador	Formula
Número promedio alelos por locus (NPA)	$NPA = \left(\frac{1}{K}\right) \sum_{i=1}^K n_i$ <p>K = número de loci n_i = N° de alelos detectados por locus</p>
Contenido de información polimórfica (PIC)	$PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$ <p>i = información del i-ésimo marcador. f_i = frecuencia de accesiones que presentan el alelo i. $1 - f_i$ = frecuencia de accesiones que no presentan el alelo i.</p>
Índice de marcador (IM)	$IM = PIC \times EMR$ $EMR = Na \times \beta$ <p>Na = número total de fragmentos β = fracción de bandas polimórficas</p>
Heterocigosidad observada (Ho)	$Ho = \frac{\sum Ind H}{n}$ <p>Ind H = individuos heterocigotos n = total de individuos</p>
Heterocigosidad esperada (He)	$He = 1 - \sum p_i^2$ <p>p_i = frecuencia del i-ésimo alelo en un locus</p>

5. Resultados y discusión

5.1 Concentración y pureza del ADN

La concentración promedio de las muestras de ADN fue 1088 ng/ul con un rango entre 70.30 ng/ul y 3377.69 ng/ul, lo que indicó la obtención de ADN suficiente para la ejecución del proyecto. La relación de absorbancias 260/280 y 260/230 presentó en promedio de 1.99 y 1.72 respectivamente (Tabla 5-1). La mayoría de las muestras presentaron valores de pureza óptimos ($260/280 > 1.6$; $260/230 > 1.5$), señalando baja presencia de contaminantes como compuestos aromáticos, fenoles y proteínas (Bregård *et al.* 2000). Sin embargo, dos muestras presentaron valores fuera de los rangos indicados, pero con la calidad suficiente para amplificar los microsatélites por PCR.

Tabla 5-1. Concentración y pureza del ADN de Musáceas.

	Concentración (ng/ul)	A260/280	A260/230
Promedio	1088	1.99	1.72
Desviación estándar	583.85	0.10	0.30
Rango	70.30 – 3377.69	1.37 - 2.29	0.9 - 2.22

5.2 Microsatélites

Los datos perdidos por marcador no superaron el 5%, por lo tanto, siguiendo las recomendaciones de Kalinowski *et al.* (2007), ningún marcador es descartado del análisis. Los doce microsatélites polimórficos, identificaron 206 alelos, con un promedio de 17 alelos por locus, en un rango entre 13 (Mb1134) y 23 alelos (MaOCEN01). Los resultados fueron similares a otros estudios realizados en Musáceas, como el de Ashikin *et al.* (2012) en el que fueron identificados 130 alelos (14 alelos por locus) con 9 microsatélites en 44 genotipos de Musáceas. Igualmente coincide con la investigación realizada por Irish *et al.* (2014), en donde se observaron 302 alelos (14 alelos por locus), evaluando 175 genotipos

con 21 microsatélites. Considerando que los estudios mencionados presentan una muestra poblacional y número de microsatélites, mayor y menor, respectivamente.

El PIC promedio fue de 0.10, con un rango entre 0.079 y 0.139. El IM por su parte osciló entre 0.79 y 2.14, indicando un alto valor discriminatorio para las accesiones analizadas. Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio realizado por Nunes de Jesus *et al.* (2013) donde se evaluaron 224 accesiones de *Musa* spp. con 21 microsatélites, logrando un PIC promedio de 0.20 y un IM de 2.28. El valor es el doble del obtenido, debido a que se analizó una muestra poblacional mayor y más diversa (incluye plátanos). Es necesario precisar que el PIC máximo podría ser de 0.5 debido a que el cálculo se efectuó con la fórmula propuesta por el autor anteriormente mencionado.

Los valores de PIC de los marcadores MaOCEN08 (0.139) y Mb163 (0.079) son los esperados. Al igual que la investigación realizada por Ashikin *et al.* (2012), MaOCEN08 se destaca como altamente informativo, al contrario de Mb163. En cuanto al IM, seis microsatélites (MaOCEN17, MaOCEN04, MaOCEN08, Mb1113, MaOCEN01 y mMACIR08) revelaron mayor información, teniendo en cuenta las consideraciones tomadas por Nunes de Jesus *et al.* (2013), en donde establece que los marcadores que superan el valor medio, para este caso 1.37, se califican como altamente informativos (Tabla 5-2).

La heterocigosidad observada presentó valores altos en un rango entre 0.44 y 0.94 con un promedio de 0.80, al igual que la heterocigosidad esperada que osciló entre 0.65 y 0.90 con un promedio de 0.81. Los promedios similares sugieren que algunos de los microsatélites estarían en equilibrio de Hardy Weinberg, lo cual no indica que la colección se comporte como una población panmíctica ideal, dado que se debe tener presente que el teorema fue definido originalmente para poblaciones diploides con reproducción sexual aleatoria y el género *Musa* está compuesto de individuos con distintos niveles de ploidía y de reproducción principalmente asexual. En consecuencia, esto se debe a un sesgo introducido al adaptar el cálculo de heterocigosidad a una población con características diferentes.

Tabla 5-2. Estimadores usados para la caracterización de los microsatélites.

Locus	N	Na	Rango (pb)	PIC	IM	He	Ho
Mb163	98	14	176-210	0.079	0.790	0.65	0.44
Mb169	97	19	368-456	0.092	1.288	0.84	0.85
MaOCEN17	97	15	156-190	0.125	1.375	0.82	0.92
Mb1134	97	13	372-408	0.119	0.952	0.82	0.57
MaOCEN04	99	17	144-178	0.126	2.142	0.90	0.90
MaOCEN08	96	14	240-278	0.139	1.807	0.85	0.91
MaOCEN13	96	18	138-190	0.102	1.326	0.79	0.88
Mb1113	96	20	358-414	0.112	1.456	0.86	0.86
MaOCEN01	96	23	218-278	0.093	1.488	0.87	0.91
mMaCIR264	97	17	220-342	0.086	1.118	0.81	0.52
mMaCIR08	96	17	226-268	0.111	1.554	0.81	0.93
MMACIR39	98	19	298-358	0.095	1.235	0.81	0.94
Promedio		17.16		0.106	1.377	0.81	0.80

N: número de individuos; Na: número de alelos; Rango: indicado en pares de bases; PIC: contenido de información polimórfica; IM: Índice de marcador; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

5.3 Diversidad intrapoblacional

Los bananos y ornamentales presentaron 14.1 y 8.5 alelos promedio por locus, respectivamente, con lo que se infiere una alta variabilidad dentro de los grupos. Los bananitos por el contrario mostraron una menor diversidad, representada en 6.25 alelos promedio por locus (tabla 5-3). Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Caicedo (2015), en donde se hizo la caracterización morfológica, física y química de 185 accesiones del banco de musáceas de Agrosavia y concluye que existe alta variabilidad genética entre tipos y genomas, sin embargo, para el caso de los bananitos la diversidad es limitada.

La heterocigosidad esperada promedio, considerando los grupos, fue para bananos de 0.836 ± 0.01 , ornamentales 0.848 ± 0.05 , lo que indicaría la presencia de una alta diversidad genética; por el contrario, los bananitos presentaron un valor inferior de 0.569 ± 0.05 , que se traduce en una menor diversidad (Nei, 1973).

Por otro lado, la heterocigosidad observada promedio fue para bananos de 0.829 ± 0.02 , bananitos 0.770 ± 0.01 y ornamentales 0.708 ± 0.10 . Cabe resaltar que por la esterilidad y la propagación vegetativa propia de las Musáceas se esperarían valores bajos de heterocigosidad observada, no obstante, según Jain & Priyadarshan (2009) los valores

altos estarían asociados a factores como: 1) la mayoría de los bananos silvestres diploides utilizados en hibridación son heterocigotos, 2) el modo de reproducción sexual de los cultivares ancestrales (autógama facultativa) permitió que hubiera polinización cruzada entre los clones diploides de gametos $2n$ y n , dando origen a cultivares triploides y tetraploides, aumentando la variabilidad, 3) los triploides ancestrales caracterizados por un bajo grado de esterilidad provocaron mutaciones somáticas naturales, que contribuyeron a la diversidad, 4) heterocigosidad estructural, 5) la heterocigosidad observada promedio de las poblaciones de Musáceas se ha estimado en cerca del 70%, 6) los bananos comestibles son el resultado de una combinación de frutos partenocárpicos, esterilidad y rendimiento de pulpa, lo que conlleva a una reproducción vegetativa para su propagación, que favorece la conservación del alto porcentaje de heterocigotos.

Los diploides mostraron una heterocigosidad observada alta ($H_o=0.747 \pm 0.08$), en comparación con el estudio realizado por Nunes de Jesús *et al.* (2013) donde se reporta de 0.624 para diploides, sin embargo, en este caso la colección evaluada incluye accesiones de *Musa balbisiana* y para esta especie la heterocigosidad es más baja (0.374) y por lo tanto afecta el promedio general.

Tabla 5-3. Estimadores de diversidad genética para tipo y genoma de Musáceas.

Nombre	NPA	Hep	Hop
Bananos	14.10	0.836 ± 0.01	0.829 ± 0.02
Bananitos	6.25	0.569 ± 0.05	0.770 ± 0.01
Ornamentales	8.50	0.848 ± 0.05	0.708 ± 0.10
Diploides	12.25	0.709 ± 0.04	0.747 ± 0.08
Triploides	9.08	0.775 ± 0.02	0.877 ± 0.04
Tetraploides	7.00	0.790 ± 0.01	0.931 ± 0.03

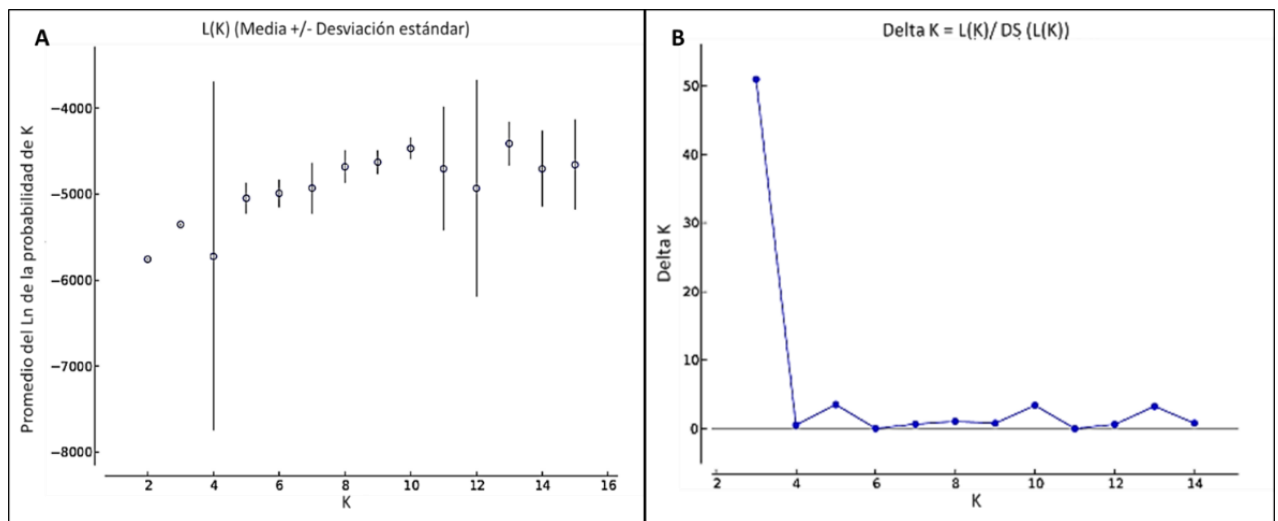
N: número de individuos; NPA: número promedio de alelos; H_o : heterocigosidad observada promedio; H_e : heterocigosidad esperada promedio.

Finalmente, los estimadores de diversidad genética permitieron reconocer a las ornamentales como el tipo de musácea más diverso debido a que está compuesto de accesiones de diferentes especies; seguido de los bananos que incluyen diversas accesiones de origen silvestre y domesticadas de múltiples regiones del mundo; y por último los bananitos, hallazgo que parece indicar que este tipo de musácea posiblemente ha pasado por un proceso de selección amplio, que ha ocasionado la disminución del número de alelos y el aumento de la frecuencia de los restantes.

5.4 Estructura genética

La estimación del número aproximado de subpoblaciones se hizo, inicialmente, basándose en el valor máximo del logaritmo de la probabilidad ($\text{LnP}(K)$), sin embargo, no alcanzó un valor estable y continuó incrementando, al igual que la desviación estándar, lo cual no permitió establecer el número de subpoblaciones. Por ello se adoptó el enfoque propuesto por Evanno *et al.* (2005) fundamentado en el cambio de la probabilidad entre K (ΔK). El método resultó ser más sensible, debido a que presenta un punto máximo de ΔK , indicando claramente que el número de subpoblaciones más probables es 3 (Figura 5-3).

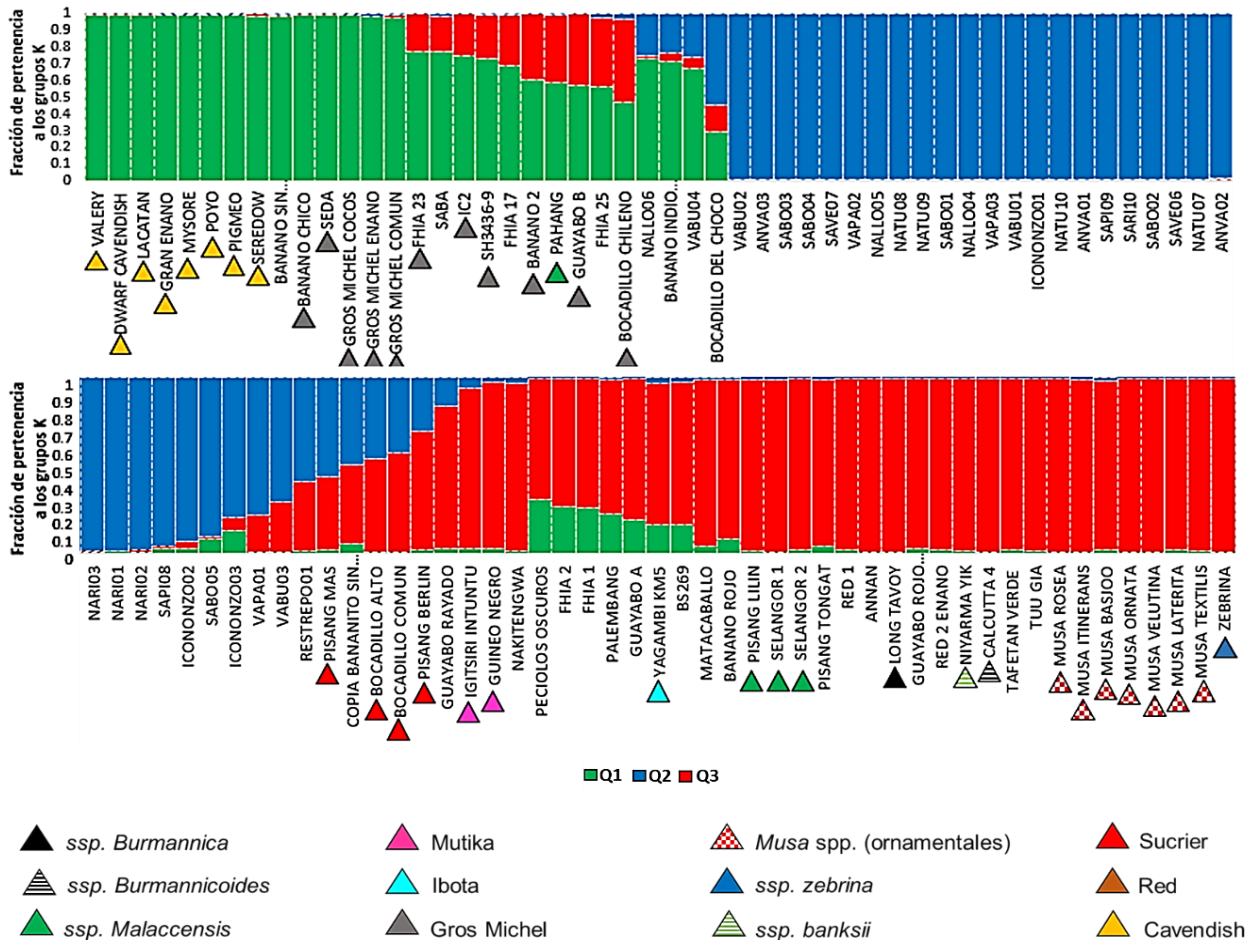
Figura 5-1. A. Valores medios del logaritmo de la probabilidad de K ($\text{LnP}(K)$) para 10 corridas independientes para cada K . **B.** Valores de ΔK para cada función K basado en el método de Evanno *et al.* (2005).



Las accesiones fueron asignadas a cada una de las poblaciones de acuerdo al valor de pertenencia de mayor magnitud (Q), que expresa la proporción del genoma compuesto por los alelos de la población ancestral, de este modo, la estructura genética de la colección de Musáceas estuvo conformada por tres poblaciones, donde dos de ellas estuvieron compuestas principalmente por bananos (Q_1 y Q_3) y la otra por bananitos (Q_2) (Figura 5-4). Las accesiones presentaron altos valores de pertenencia, dando lugar a poblaciones discretas en su mayoría constituidas por recursos genéticos propios. Adicionalmente se evidencia el bajo flujo genético a causa de la esterilidad y propagación vegetativa.

Las accesiones de la población Q_1 , con valores de pertenencia promedio de 0.83, en su mayoría con genomas triploides y tetraploides, se caracterizaron por pertenecer a los subgrupos Gros michel y Cavendish, cultivados por sus altos rendimientos y resistencias a plagas y enfermedades específicas. También se presentaron accesiones con combinación de genomas, como es de esperarse, ya que los híbridos FHIA 23, IC2, SH3436-9, FHIA 17, FHIA 25, FHIA 1 y FHIA 2, provienen de los cruces interespecíficos de bananos domesticados y silvestres, y por ello se evidencia una pertenencia significativa a ambas poblaciones (Q_1 y Q_3).

Figura 5-2. Diagrama de barras para las poblaciones inferidas con el análisis bayesiano en las accesiones de *Musa* spp.



La población Q_2 estuvo constituida en su mayoría por accesiones con un alto valor de pertenencia (promedio de 0.89), sin embargo, también exhibió accesiones con combinación de genomas de las poblaciones Q_2 y Q_3 , como lo son: Icononzo 03, VAPA01,

VABU03, Restrepo 01, Pisang mas, bocadillo alto, bocadillo común y bocadillo del choco. Este último puede considerarse un recurso promisorio por poseer genomas de las tres poblaciones. La constitución genética de estos bananitos resalta la relación y descendencia que presenta esta población a partir de bananos con características silvestres, principalmente que poseían frutos pequeños y de altos grados brix.

La población Q_3 con una alta pertenencia promedio de 0.91 estuvo conformada principalmente por bananos silvestres, entre ellos están Zebrina, Calcutta 4, Pisang lilin, Pisang tongat, Pisang berlin y las ornamentales, entre otras. Es de anotar nuevamente que, Q_1 y Q_2 presentan accesiones con una mezcla de la población Q_3 , señalando la relación que poseen estas poblaciones con materiales silvestres de los cuales posiblemente se originaron.

Cabe mencionar hallazgos puntuales con respecto a determinadas accesiones. El FHIA 2, un híbrido tetraploide AAAA con características del cultivar Cavendish, solo presentó un valor Q_1 de 0.265, Nunes de Jesus *et al.* (2013) obtuvo resultados similares sugiriendo su pertenencia al subgrupo Pome en lugar de Cavendish.

Pahang por su parte, presentó un valor de 0.589, dado que esta accesión contribuyó con uno de los tres genomas que componen a los Cavendish (Davey *et al.* 2013). La relación que presenta esta accesión con el cultivar permite sugerirla como un recurso invaluable para programas de mejoramiento, teniendo en cuenta que los Cavendish son los mayormente utilizados en plantaciones comerciales a nivel mundial.

El “banano sin clasificar” con una pertenencia del 0.983 confirmó su relación con los Cavendish concediendo un indicio relevante sobre su origen. La accesión BS269 con una pertenencia para Q_1 y Q_3 de 0.164 y 0.81, respectivamente, valida que esta accesión puede estar clasificada erróneamente como un bananito. El banano Pisang berlin y el bananito Pisang mas poseen una combinación de genomas de las poblaciones Q_2 y Q_3 , probablemente porque ambos materiales son fértiles y pueden ser producto de polinizaciones cruzadas (Moens *et al.* 1997; Uma *et al.* 2011).

5.5 Distancia genética

La disimilaridad promedio entre las accesiones fue de 0.65. En cuanto al análisis por tipo de Musácea los bananos presentaron un valor de 0.66, los bananitos de 0.26 y las ornamentales de 0.86, indicando que a nivel general el grupo de ornamentales y bananos está representado por accesiones altamente diferenciadas con respecto a los bananitos, en donde el valor bajo señalaría una escasa divergencia entre las accesiones.

En el análisis de toda la colección, las accesiones con mayor disimilitud son *Musa velutina* (ornamental) y Pisang berling con un valor de 1.19, debido a que éstas pertenecen a especies diferentes.

Por otra parte, en el grupo de los bananos la accesión que muestra mayor diferencia es ANNAN con un promedio de disimilaridad de 0.88, concordando con lo reportado por Caicedo (2015) dado que posee características morfológicas únicas con respecto a los otros bananos, como lo son la ausencia de manchas en la base del peciolo y un pedúnculo glabro. El banano Pisang berling también tiene un contraste significativo con todas las accesiones de la colección con un promedio de 0.81, a excepción de la relación que obtuvo con los bananitos Pisang mas (0.37), bocadillo común (0.44) y bocadillo alto (0.45), que puede deberse a que son morfológicamente similares en la forma del racimo, el peso del raquis, porcentaje de pulpa de la mano, entre otras (Caicedo, 2015).

Las accesiones con mayor cercanía genética para los bananos son: Mysore, Lacatan, Poyo, Dwarf Cavendish con un rango estrecho entre 0.05 y 0.094, que es lo esperado teniendo en cuenta que son triploides que pertenecen al mismo subgrupo Cavendish.

Los bananos Niyarma Yik y Tuu Gia (disimilaridad de 0.0) posiblemente sean duplicados, ambas accesiones provienen de Bélgica, pertenecen a la especie *Musa acuminata* con genoma AA y son similares morfológicamente, sin embargo, de acuerdo con Caicedo (2015) presentan diferencias a nivel del pseudotallo, peciolo, brácteas, flores masculinas y frutos; que pueden ser atribuidas a mutaciones puntuales en el genoma, que no se ven reflejados en el análisis realizado con los microsatélites usados.

En cuanto al grupo de los bananitos, la accesión BS269 fue la que presentó un mayor contraste con el resto de las accesiones con un promedio de disimilaridad de 0.77, expuesto en un rango de 0.70 – 0.84. Morfológicamente también discrepa de las demás accesiones por presentar cera en las vainas y en la lámina, posición de los frutos paralelos

al raquis y presencia de semillas; características que según el trabajo de Caicedo (2015) no poseen, en general, los bananitos. Esta accesión es clave para la colección debido a que además de su variabilidad genética, el análisis físico y químico indicó características promisorias como su precocidad, expresada en la variable días flor a cosecha (60 días), y altas concentraciones de ácidos orgánicos y azúcares (Ibíd.).

Por el contrario, las accesiones con una estrecha relación genética son: ANVA01, ANVA02, ANVA03, NARI01, NARI02, NARI03, NATU07, NATU08, NATU09, NATU10, SABO01, SABO03, SABO04, SABO05, SAPI09, SARI10, SAVE06, SAVE07, NALLO04, NALLO05, VAPA02, VAPA03, VABU01, VABU02, ICO01 e ICO03 con valores de 0.0 a 0.1, lo que indicaría que fueron desarrollados a partir de un germoplasma con una diversidad escasa.

La limitada diferenciación entre las accesiones puede estar fundamentada en que el 97% de éstas fueron colectadas, en diferentes regiones de Colombia, empleando principalmente un criterio de selección morfológico. Dada esta situación, accesiones que aparentemente eran diferentes fenotípicamente en el momento de la recolección presentaron características similares al colocarlas bajo las mismas condiciones ambientales del banco, por lo tanto, posiblemente sean duplicados.

El análisis del perfil genético con los microsatélites utilizados señaló que para los bananitos las posibles accesiones con igual genotipo son: NATU08, NATU09, SABO03 y SABO01; en segundo lugar, las accesiones SAVE07, VAPA03 y ANVA03; por último, VABU01 e ICO01. En el primer conjunto mencionado, de acuerdo con el estudio morfológico realizado por Caicedo (2015) únicamente la accesión SABO03 difiere significativamente con características a nivel del pseudotallo, hijos, inflorescencia y yema masculina. Las accesiones del segundo conjunto, según el mismo autor, igualmente difieren ligeramente entre sí con respecto a las flores masculinas y posición de frutos. Finalmente, para el último conjunto no fue posible hacer la comparación debido a que ICONONZO 01 no ha sido caracterizado morfológicamente.

La presencia de duplicados tiene implicaciones negativas por el manejo de las colecciones de germoplasma, dado que no aportan a la variabilidad genética y conllevan al sesgo de la misma (Singh *et al.* 2019). Adicionalmente, se incrementa el costo que implica establecer y administrar el banco de Musáceas por el tamaño de las plantas, la adaptación a condiciones del suelo, programas de fertilización, labores culturales, control de arvenses,

plagas y enfermedades, entre otras actividades de mantenimiento. Por lo anterior es necesario evaluar con detalle las características morfológicas y productivas de las accesiones reportadas como posibles duplicados y de este modo eliminar accesiones que no aporten variabilidad.

Las accesiones pertenecientes al grupo de las ornamentales (*M. Textilis*, *M. Basjoo*, *M. Laterita*, *M. Ornata*, *M. Velutina* y *M. Itinerans*) presentaron un valor promedio de 0.86, en un rango entre 0.69 y 1.10, señalando una amplia diferenciación entre ellas y con relación al resto de la colección. El resultado es el esperado teniendo en cuenta que todas las ornamentales pertenecen a una especie diferente del género *Musa*.

5.6 Análisis de agrupamiento

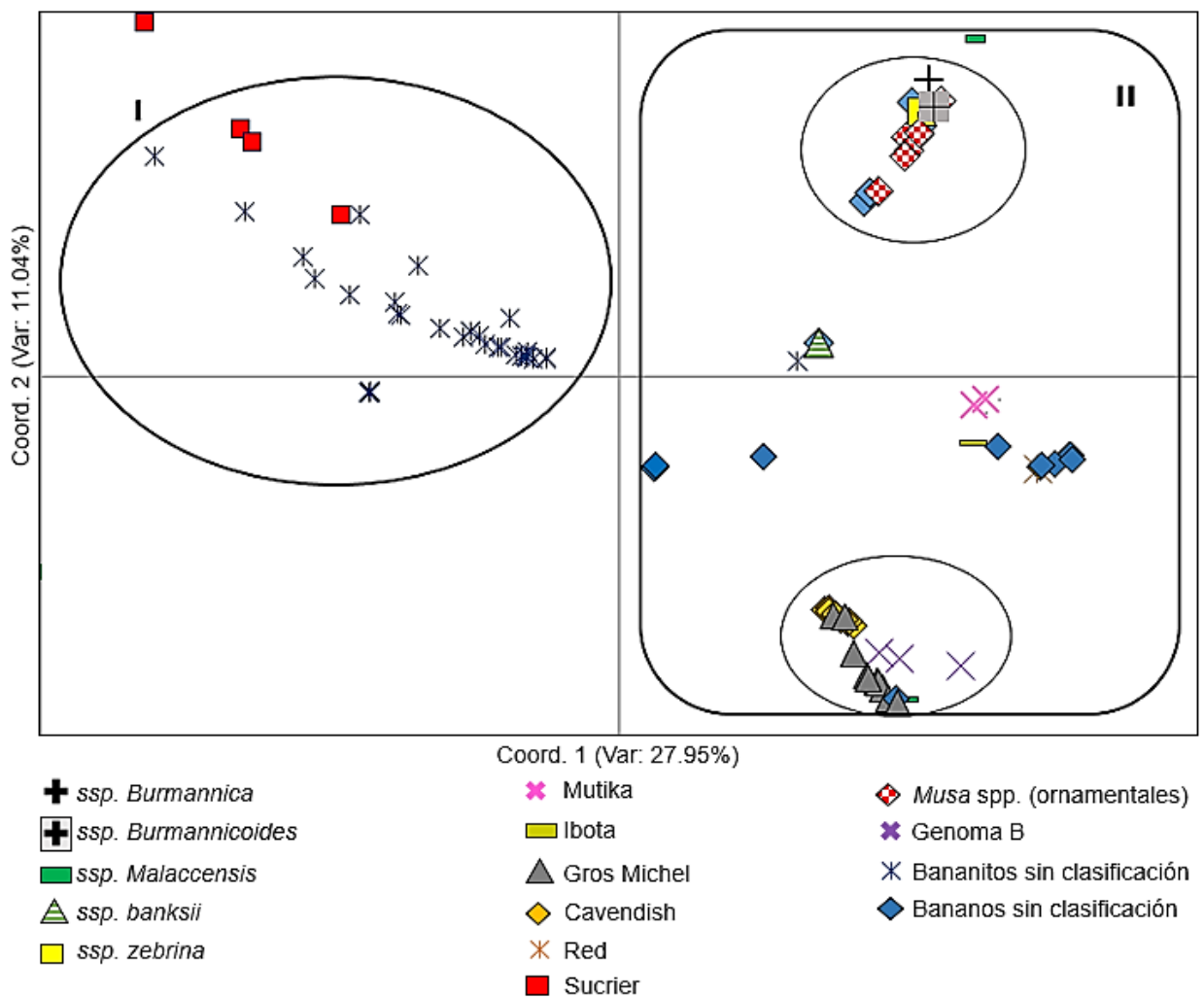
El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en el índice de dissimilaridad de Dice (1945) permitió diferenciar dos agrupaciones. El grupo I, representado por bananitos, ocupa el cuadrante superior izquierdo y el grupo II, conformado por bananos y ornamentales, se ubica en los cuadrantes derechos (figura 5-1). El PCoA explica aproximadamente el 39% de la variación y según Messmer *et al.* (1992) este valor debe estar por encima del 25% para realizar inferencias poblacionales, por lo tanto la baja distorsión de las distancias y las relaciones genéticas permitió confirmar el patrón de agrupación por tipo de musácea.

En el grupo conformado por bananitos resalta la estrecha cercanía genética y baja variabilidad entre sus accesiones. Por el contrario, los bananos presentes en el grupo II confirman una mayor diversidad, debido a su amplia área de distribución en la gráfica. También refleja la tendencia de las accesiones a subagruparse por el cultivar al que pertenecen, en donde logran diferenciarse los Mutika, Cavendish y Gros Michel, estos dos últimos a su vez revelan una estrecha relación genética. Igualmente, las ornamentales se destacaron conformando un subgrupo expresando su cercanía con los bananos.

Por otro lado, el banano Pisang berlin cv. Sucrier no se ubicó en ninguno de los grupos confirmando la discrepancia con las demás accesiones del banco. Sin embargo, es notable que presentó una relación más estrecha con los bananitos quizás porque en éste grupo están contenidos otras accesiones del mismo cultivar.

Las accesiones pertenecientes o relacionadas a un cultivar específico se caracterizan, en general, por tener una alta cohesión genética y posiblemente un ancestro común, lo que se ve reflejado en los rasgos agronómicos y de calidad de la fruta (Caicedo, 2015). Se cree que la escasa divergencia genética se atribuye a la variación somaclonal, en ausencia de la etapa sexual en la evolución, lo que justifica las pequeñas diferencias genéticas (Nunes de Jesus *et al.* 2013).

Figura 5-3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia genética de Dice (1945) para 99 accesiones de *Musa* spp.



El análisis de conglomerados permitió identificar 3 agrupaciones, evidenciando la fuerte inclinación de las accesiones a separarse por tipo de Musácea (tabla 5-4). En el agrupamiento I se observa la mayor diversidad genética representada por accesiones de

bananos y ornamentales, mientras que los grupos II y III estuvieron conformados principalmente por bananitos. Sin embargo, las accesiones presentes en el agrupamiento III discrepan del resto de genotipos aportando variabilidad genética al grupo de bananitos; concordando con el análisis de disimilitud (Figura 5-2).

Tabla 5-4. Agrupación por tipo de Musáceas basado en el dendograma usando el método de neighbor joining (Saitou & Nei, 1987).

Tipo/ Cluster	I	II	III	Total
Banano	53		1	54
Bananito	2	31	6	39
<i>Musa spp</i>	6			6
Total	61	31	7	99

En el conglomerado I se agruparon los Gros Michel, y se observó la relación de estos con los híbridos SH3436-9, FHIA 17, FHIA 23, que es lo esperado teniendo en cuenta que estas accesiones descienden del mismo parental el Gros Michel Highgate (Kaemmer *et al.* 1997; Smith *et al.* 2014). Igualmente, los Cavendish formaron un subgrupo, en este se destaca la presencia de la accesión “banano sin clasificar”, siendo esta información relevante para el conocimiento de su origen.

La relación entre el FHIA 1 (AAAB) y FHIA 25 (AAB) se debe a que provienen del mismo parental SH3142 (tabla 5-5). Estos a su vez presentan una clara cercanía a SABA (ABB/BBB – *Musa acuminata* x *Musa balbisiana*), que puede deberse a que todos contienen genes de *Musa balbisiana* (Castillo *et al.* 2015; Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 1990; Ray Rowe, 2002). Por otra parte, el FHIA 2 no se agrupó con los tetraploides pero sí con los Pisang, que puede explicarse debido a que este híbrido proviene del cruce entre Williams x SH3393, y este último a su vez es descendiente de Pisang Lilin y Pisang Jari Buaya (Romero & Sutton, 1997).

Las ornamentales a pesar de presentar una amplia diferenciación genética según los valores de disimilitud de Dice (1945), constituyeron un subgrupo del conglomerado I. Cabe destacar la conexión de las ornamentales de la sección *Rhodochlamys* con los bananos (*Musa acuminata* - sección *Eumusa*), lo cual concuerda con los estudios realizados por Ude *et al.* (2002).

Figura 5-4. Dendrograma generado por el método de neighbor joining (Saitou & Nei, 1987) para el análisis de 99 accesiones de Musáceas.



Tabla 5-5. Parentales de híbridos de Musáceas.

Accesión	Parentales	Fuente
FHIA 23	Highgate x 2n	Smith <i>et al.</i> 2014
SABA	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i>	Castillo <i>et al.</i> 2015
IC2	Highgate x 2n	Kaemmer <i>et al.</i> 1997; Smith <i>et al.</i> 2014
SH3436-9	Highgate x SH3142	Kaemmer <i>et al.</i> 1997; Smith <i>et al.</i> 2014
FHIA 17	Highgate x SH3362	Smith <i>et al.</i> 2014
FHIA 25	SH3142 x SH3648	Ray Rowe, 2002
FHIA 2	Williams x SH3393	Romero & Sutton, 1997
FHIA 1	Prata ña x SH3142	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 1990
SH3362	SH 3142 x SH3217	Ray Rowe, 2002
SH3393	Pisang jari buaya x Pisang lilin	Romero & Sutton, 1997
SH3142	Pisang jari buaya x SH1734	Ray Rowe, 2002

El comportamiento del bananito BS269 discrepa con respecto a los otros de su tipo. Teniendo en cuenta que no está definido el cultivar al cual pertenece la accesión, es de resaltar que según Caicedo (2015) morfológicamente es similar a los bananos con lo que se podría deducir que puede estar erróneamente catalogada como bananito.

El grupo II representado por bananitos expuso la estrecha relación genética entre las accesiones que puede estar fundamentada en que probablemente fueron desarrollados de un material genético de diversidad escasa y a la esterilidad propia del género *Musa*. Adicionalmente se ven reflejadas las accesiones con igual perfil genético concordando con los datos obtenidos a partir del análisis de disimilitud (Nunes de Jesus *et al.* 2013).

El conglomerado III compuesto principalmente por bananitos del cultivar Sucrier, sobresalió por la relación presentada con el bocadillo del choco, Icononzo-03 y la copia de bananito sin clasificar con lo que se puede deducir que posiblemente estas accesiones correspondan a este cultivar. Así mismo cabe anotar que este grupo aporta variabilidad a los bananitos, lo que sugiere que pueden ser fuentes de genes útiles para los programas de mejoramiento, como por ejemplo el Pisang mas que se distingue por su resistencia a los nemátodos *Radopholus similis* y *Meloidogyne incognita* (Suganthagunthalam *et al.* 2010).

Con respecto al genoma, los agrupamientos II y III estuvieron conformados por accesiones diploides AA, mientras que en el grupo I se presentaron todos los niveles de ploidía. Sin embargo, los subgrupos evidencian que los triploides y tetraploides tienden a agruparse por separado, como es el caso del FHIA 1, FHIA 25 y SABA.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Los microsatélites demostraron ser útiles para la evaluación de la diversidad genética de la colección de *Musa* spp por su alto poder discriminante, destacándose como los marcadores más informativos: MaOCEN01, MaOCEN04, MaOCEN08, MaOCEN17, Mb1113 y mMaCIR08.

Los bananitos presentaron baja diversidad, expresada en un bajo número de alelos y heterocigosidad esperada, contrario a los bananos y las ornamentales que exhibieron una variabilidad significativamente superior en los mismos términos.

Las siguientes accesiones son potencialmente duplicados, por su nula distancia y perfil genético idéntico: en primer lugar, NATU08, NATU09, SABO03 y SABO01; en segundo lugar, SAVE07, VAPA03 y ANVA03; seguido de VABU01 e ICO01; Por último, Niyarma yik y Tuu gia.

Los bananitos presentan una alta cohesión genética producto de una disimilaridad baja, por el contrario, los bananos y ornamentales exponen una alta diferenciación producto de la inclusión de híbridos y especies diferentes, respectivamente.

La colección de bananos y bananitos está estructurada en tres poblaciones discretas con una alta pertenencia y un escaso flujo genético, Q1 por bananos de los cultivares comerciales, Q2 por bananos con características silvestres y especies ornamentales, y por último Q3 por bananitos.

6.2 Recomendaciones

Enriquecer el germoplasma almacenado de la colección de Musáceas de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) incorporando materiales, principalmente de bananito para aumentar la diversidad genética disponible.

Se recomienda hacer un análisis adicional con el propósito de verificar las accesiones que probablemente estén duplicadas, para eventualmente tomar medidas para la reducción de costos de mantenimiento.

Es importante continuar con las investigaciones, implementado citometría de flujo y la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) para conocer la ploidía exacta de las accesiones y realizar un análisis profundo que permita aprovechar los recursos genéticos del banco.

A. Anexo: Accesiones de Musáceas

Código	Accesión	Tipo	Especie	Genoma	Subgrupo
86	ANNAM	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
155	ANVA 01	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
156	ANVA 02	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
157	ANVA 03	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
113	BANANO 2	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Gros Michel
112	BANANO CHICO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Gros Michel
193	BANANO INDIO COME SENTAO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	
195	BANANO ROJO	Banano	<i>Musa acuminata</i>		
106	BANANO SIN CLASIFICAR	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	
76	BOCADILLO ALTO	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	Sucrier
114	BOCADILLO CHILENO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Gros Michel
75	BOCADILLO COMUN	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	Sucrier
143	BOCADILLO DEL CHOCO	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
145	BS269	Banano	<i>Musa acuminata</i>		
134	CALCUTTA 4	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	Burmannicoides
107	DWARF CAVENDISH	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Cavendish
29	FHIA 01	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAAB	
98	FHIA 17	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAAA	
95	FHIA 2	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAAA	
96	FHIA 23	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAAA	
34	FHIA 25	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAB	
102	GRAN ENANO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Cavendish
109	GROS MICHEL COCOS	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Gros Michel
108	GROS MICHEL COMUN	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	
110	GROS MICHEL ENANO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	
121	GUAYABO A	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Red
146	GUAYABO B	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Gros Michel
189	GUAYABO RAYADO	Banano	<i>Musa acuminata</i>		
87	GUAYABO ROJO ESPLENDOR	Banano	<i>Musa acuminata</i>		
116	GUINEO NEGRO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Mutika
94	IC 2	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAAA	Gros Michel
185	ICONONZO 01	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
186	ICONONZO 02	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
187	ICONONZO 03	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
118	IGITSIRI INTUNTU	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	
100	LACATAN	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Cavendish

Código	Nombre Accesoión	Tipo	Especie	Genoma	Subgrupo
85	LONG TAVOY	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	Burmannica
194	MATACABALLO	Banano	<i>Musa acuminata</i>		
124	MUSA BASJOO	Ornamental	<i>Musa Basjoo</i>	Eumusa	
131	MUSA ITINERANS	Ornamental	<i>Musa itinerans</i>	Eumusa	
128	MUSA LATERITA	Ornamental	<i>Musa laterita</i>	Rhodochlamys	
129	MUSA ORNATA	Ornamental	<i>Musa ornata</i>	Rhodochlamys	
90	MUSA ROSEA	Ornamental	<i>Musa acuminata</i>		
122	MUSA TEXTILIS	Ornamental	<i>Musa textilis</i>	Australimusa	
130	MUSA VELUTINA	Ornamental	<i>Musa velutina</i>	Rhodochlamys	
99	MYSORE	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Cavendish
117	NAKITENGWA	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	
158	NALLO 04	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
159	NALLO 05	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
160	NALLO 06	Banano	<i>Musa acuminata</i>		
161	NARI 01	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
162	NARI 02	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
163	NARI 03	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
164	NATU 07	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
165	NATU 08	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
166	NATU 09	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
167	NATU 10	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
82	NIYARMA YIK	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	ssp banksii
88	PAHANG	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	Malaccensis
80	PALEMBANG	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
84	PECIOLOS OSCUROS	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
103	PIGMEO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Cavendish
133	PISANG BERLIN	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
79	PISANG LILIN	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
77	PISANG MAS	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
78	PISANG TONGAT	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
104	POYO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AAA	Cavendish
148	RED 1	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
149	RED 2. ENANO	Banano	<i>Musa acuminata</i>	AA	
188	RESTREPO 01	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
1	SABA	Banano	<i>Musa acuminata</i>	ABB/BBB	Saba
170	SABO 01	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
171	SABO 02	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
168	SABO 03	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
169	SABO 04	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
172	SABO 05	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
175	SAPI 08	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
173	SAPI 09	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
174	SARI 10	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	
176	SAVE 06	Bananito	<i>Musa acuminata</i>	AA	

Código	Nombre Accesoión	Tipo	Especie	Genoma	Subgrupo
177	SAVE 07	Bananito	Musa acuminata	AA	
111	SEDA	Banano	Musa acuminata	AAA	Gros Michel
89	SELANGOR 1	Banano	Musa acuminata	AA	Malaccensis
91	SELANGOR 2	Banano	Musa acuminata	AA	Malaccensis
101	SEREDOW	Banano	Musa acuminata	AAA	Cavendish
97	SH3436-9	Banano	Musa acuminata	AAAA	
120	TAFETAN VERDE	Banano	Musa acuminata	AAA	
81	TUUGIA	Banano	Musa acuminata	AA	
184	VABU 01	Bananito	Musa acuminata	AA	
183	VABU 02	Bananito	Musa acuminata	AA	
182	VABU 03	Bananito	Musa acuminata	AA	
178	VABU 04	Banano	Musa acuminata		
105	VALERY	Banano	Musa acuminata	AAA	Cavendish
181	VAPA 01	Bananito	Musa acuminata	AA	
180	VAPA 02	Bananito	Musa acuminata	AA	
179	VAPA 03	Bananito	Musa acuminata	AA	
115	YANGAMBI KM 5	Banano	Musa acuminata	AAA	Ibota
83	ZEBRINA	Banano	Musa acuminata	AA	Acuminata
144	COPIA DE BANANITO SIN CLASIFICAR	Bananito	Musa acuminata		

B. Anexo: Calidad del ADN de Musáceas

Cod	260/280	260/230	Concentración ng/ul	Cod	260/280	260/230	Concentración ng/ul
1	2.06	1.13	795.92	99	2.00	2.04	1422.92
29	2.07	1.45	1305.35	100	1.96	1.64	690.82
34	2.26	1.10	634.23	101	2.03	1.64	1178.61
75	1.91	1.87	1527.62	102	2.01	1.77	1466.94
76	1.99	2.00	1080.28	103	2.00	1.55	748.87
77	1.90	1.21	326.00	104	2.02	1.79	900.70
78	2.00	1.98	443.05	105	2.29	0.90	387.80
79	2.01	1.86	1359.33	106	1.97	1.89	344.97
80	2.06	1.51	1988.15	107	2.00	2.22	1147.48
81	2.03	1.64	975.08	108	1.98	1.40	292.45
82	1.96	1.67	315.54	109	1.99	1.96	1397.12
83	2.00	1.66	1352.97	110	1.96	1.90	237.89
84	2.00	1.87	1188.49	111	1.37	1.21	70.30
85	2.01	2.07	1549.06	112	2.20	0.99	836.03
86	2.01	2.08	1813.07	113	2.08	1.31	1010.88
87	2.16	1.08	391.82	114	2.19	1.02	408.10
88	1.99	1.89	426.95	115	2.07	1.24	816.66
89	1.95	1.07	787.61	116	2.05	1.61	1521.28
90	2.01	1.91	1359.57	117	2.02	1.65	1148.13
91	1.99	2.05	1251.28	118	1.99	1.50	758.64
94	1.99	2.02	526.77	120	1.76	2.19	404.18
95	1.98	1.82	328.38	121	2.00	1.78	713.29
96	2.00	1.81	498.53	122	2.00	1.90	1184.97
97	2.05	1.53	1735.21	124	2.00	1.77	667.91
98	1.98	1.98	1082.90	128	1.98	2.21	970.68

Cod	260/280	260/230	Concentración ng/ul	Cod	260/280	260/230	Concentración ng/ul
129	2.03	1.76	1535.73	169	2.05	1.56	1890.28
130	1.99	1.47	435.04	170	1.99	1.97	1294.63
131	1.96	2.11	956.23	171	1.88	1.94	677.62
133	1.91	2.09	780.73	172	1.98	1.70	1154.49
134	2.05	1.72	1842.64	173	1.99	1.69	1112.29
143	1.98	2.02	978.94	174	2.03	1.62	1579.26
144	1.88	1.89	3236.25	175	2.04	1.54	1683.32
145	1.99	1.77	1270.19	176	1.99	1.73	1085.39
146	1.89	0.90	120.64	177	1.99	1.61	965.83
148	1.98	1.93	498.39	178	2.03	1.32	862.39
149	2.03	1.45	705.82	179	2.00	1.76	1412.64
155	2.01	1.62	1033.96	180	1.95	1.83	809.99
156	2.04	1.72	1768.55	181	2.00	1.43	1506.25
157	2.01	1.92	1531.31	182	1.89	1.76	599.14
158	2.06	1.48	1909.76	183	1.98	1.96	1879.02
159	2.03	1.71	1124.76	184	1.79	1.87	3377.69
160	1.96	1.86	719.27	185	1.97	2.02	1114.20
161	2.00	1.92	1721.97	186	1.96	1.83	1107.03
162	2.05	1.63	1175.33	187	2.02	1.68	2097.91
163	1.99	2.07	933.59	188	1.97	1.86	1195.40
164	2.01	1.94	1598.87	189	1.87	2.03	561.86
165	2.01	1.79	2202.24	193	2.02	1.43	976.33
166	2.01	1.88	1431.49	194	1.79	2.07	301.64
167	2.01	1.80	1345.59	195	1.95	1.96	877.95
168	1.99	1.98	968.10				

Bibliografía

- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología Molecular*, 541–566.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., & Pilkauskas, P. (2004). La economía mundial del banano: 1985-2002. *Fao*. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=vaNJC7-F5WIC>
- Arteaga, F. (2015). Origen y evolución del banano.
- Ashikin, N., Abdullah, P., Saleh, G. Bin, Tarwaca, E., Putra, S., & Wahab, Z. Bin. (2012). Genetic relationship among *Musa* genotypes revealed by microsatellite markers, 11(26), 6769–6775. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1319>
- Becerra, V., & Paredes, M. (2000). Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. Retrieved from <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007>
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>
- Bregård, A., Vu, P., Geitvik, G., & Børresen-Dale, A. L. (2000). Promising method for DNA extraction from paraffin embedded archive material. In *Breast Cancer Research* (Vol. 2, pp. P8-01). Springer.
- Caicedo, A. (2015). Caracterización y evaluación morfológica, física y química de introducciones del banco de germoplasma de musáceas en el Centro de Investigación Corpoica Palmira.
- Castillo, Israel, K. A. T., Baguio, S. F., Diasanta, M. D. B., Lizardo, R. C. M., Dizon, E. I., & Mejico, M. I. F. (2015). Extraction and characterization of pectin from Saba banana [*Musa 'saba'* (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana*)] peel wastes: A preliminary study. *International Food Research Journal*, 22(1), 202–207.
- Creste, S., Benatti, T., Orsi, M., Risterucci, A., & Figueira, A. (2006). Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*, 303–306. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01209.x>

- Cruz, C. D., Salgado, C. C., & Bhering, L. L. (2014). Chapter 3 - Biometrics Applied to Molecular Analysis in Genetic Diversity BT - Biotechnology and Plant Breeding (pp. 47–81). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418672-9.00003-9>
- Davey, M. W., Gudimella, R., Harikrishna, J. A., Sin, L. W., Khalid, N., & Keulemans, J. (2013). "A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids." *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-683>
- Fundacion Hondureña de Investigacion Agricola. (n.d.). No Title. Retrieved December 13, 2019, from <http://fhia.org.hn/>
- Fundacion Hondureña de Investigacion Agricola. (1990). Banano fhia-01, (504), 1–4.
- Giraldo, D., & Montoya, N. (2012). Manual para el cultivo de banano en la zona cafetera. Rionegro.
- Gonzalez, E. (2008). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Resultados Preliminares.
- Gonzalez, L. (2008). Evaluación de la diversidad genética en una colección de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de ruanda (áfrica) de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Hippolyte, I., Jenny, C., Gardes, L., Bakry, F., Rivallan, R., Pomies, V., ... Perrier, X. (2012). Foundation characteristics of edible *Musa* triploids revealed from allelic distribution of SSR markers. *Annals of Botany*, 109(5), 937–951. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs010>
- Hopp, H. E., & Hopp, E. (2014). Curso Fitopatología Molecular 2012 Marcadores Moleculares.
- Infoagronomo. (2018). Partes de la planta de banano. Retrieved from <https://www.facebook.com/infoagronomo/photos/partes-de-la-planta-de-banano/1408548909277227/>
- IPGRI, Cornell University, De Vicente, C., Lopez, C., & Fulton, T. (2004). Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares.
- Irish, B. M., Cuevas, H. E., Simpson, S. A., Scheffler, B. E., Sardos, J., Ploetz, R., & Goenaga, R. (2014). *Musa* spp . Germplasm Management: Microsatellite Fingerprinting of USDA – ARS National Plant Germplasm System Collection, (october). <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.02.0101>
- Isneider, G. (2016). El plátano , una alternativa de diversificación de cultivos y generación de nuevos ingresos en pro del aporte a la seguridad alimentaria del municipio de Planadas Tolima.

- Jain, S. M., & Priyadarshan, P. M. (2009). Breeding plantation tree crops: Tropical species. *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7>
- Kaemmer, D., Fischer, D., Jarret, R. L., Baurens, F. C., Grapin, A., Dambier, D., Lagoda, P. J. L. (1997). Molecular breeding in the genus *Musa*: A strong case for STMS marker technology. *Euphytica*, 96(1), 49–63. <https://doi.org/10.1023/A:1002922016294>
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, Mattias Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2009). CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K.
- Lacuna-Richman, C. (2002). The role of abaca (*Musa textilis*) in the household economy of a forest village. *Small-scale Forest Economics, Management and Policy (Vol. 1)*. Springer.
- Langhe, E. De, Hr, E., & Christelova, P. (2017). Molecular and cytological characterization of the global *Musa* germplasm collection provides insights into the treasure of banana diversity, 801–824. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1273-9>
- Langhe, E. De, Vrydaghs, L., De, P., Perrier, X., & Denham, T. (2009). Why Bananas Matter : An introduction to the history of banana domestication, 7, 165–177.
- Madesis, P., Ganopoulos, I., & Tsaftaris, A. (2013). Microsatellites: Evolution and Contribution. In K. S. Kantartzi (Ed.), *Microsatellites: Methods and Protocols* (pp. 1–13). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_1
- Manzo, G., Buenrostro, M. T., Guzmán, S., Orozco, M., Youssef, M., Escobedo, R. M., & Medrano, G. (2015). Genetic Diversity in Bananas and Plantains (*Musa* spp.). *Molecular Approaches to Genetic Diversity*. <https://doi.org/10.5772/59421>
- Messmer, M. M., Melchinger, A. E., Boppenmaier, J., Herrmann, R. G., & Brunklaus-Jung, E. (1992). RFLP analyses of early-maturing European maize germ plasm.
- Ministerio de Agricultura. (2017). No Title. Retrieved from <https://www.agronet.gov.co/Paginas/inicio.aspx>
- Moens, J., J.A., S., J.V, E., & Waele, D. De. (1997). Evaluation of the progeny from a cross between 'Pisang Berlin' and *M. acuminata* spp. *burmannicoides* 'Calcutta 4' for evidence of segregation with respect to resistance to black leaf streak disease and nematodes. *Distribution*, 11.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321–3323.

- Nunes de Jesus, O., Oliveira, S. De, Amorim, E. P., Ferreira, C. F., Marcello, J., Campos, S. De, Figueira, A. (2013). Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in ex situ conservation.
- Núñez, C., & Escobedo, D. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415–427.
- Organización para las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. (2018). Estadísticas sobre alimentación y agricultura. Retrieved from <http://www.fao.org/statistics/es/>
- Ospina, A., Marco, H., & Calvo, T. (2018). Elaboró : Alejandra Ospina Hoyos Marco Tulio Calvo Sánchez.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. P. (2006). DARwin Software.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2016). Pritchard, Stephens, and Donnelly on Population Structure, 204, 391–393. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.195164>
- ProMusa. (2016). Mobilizing banana science for sustainable livelihoods. Retrieved from <http://www.promusa.org/Morfología+de+la+planta+del+banano>
- Rajeev K. Varshney, Kamel Chabane, Prasad S. Hendre, Ramesh K. Aggarwal, Andreas Graner. (2007). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. 638-649.
- Ray Rowe, P. (2002). (19) United States (12) Plant Patent Application Publication (10) Pub . No.: US 2002 / 0002717 P1, 1(1).
- Rocha, P. J. (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite Molecular Markers, an Useful Tool for Genetic Selection in Oil Palm Palabras Claves. *Palmas*, 24(42), 11–25.
- Romero, R. A., & Sutton, T. B. (1997). Reaction of four *Musa* genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. *Plant Disease*, 81(10), 1139–1142. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1139>
- Saitou N, Nei M. "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution*, volumen 4, expedición 4, pp. 406-425, 1987.
- Singh, N., Wu, S., Raupp, W. J., Sehgal, S., Arora, S., Tiwari, V., Poland, J. (2019). Efficient curation of genebanks using next generation sequencing reveals substantial duplication of germplasm accessions. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37269-0>

- Smith, M. K., Langdon, P. W., Pegg, K. G., & Daniells, J. W. (2014). Growth, yield and Fusarium wilt resistance of six FHIA tetraploid bananas (*Musa* spp.) grown in the Australian subtropics. *Scientia Horticulturae*, *170*, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.029>
- Smouse, P. E., & Peakall, R. (2006). Appendix 1 – Methods and Statistics in GenAEx 6 . *5*, *502*, 1–26.
- Suganthagunthalam, D., Elsen, A., & Waele, D. De. (2010). Identification of combined resistance to *Radopholus similis* and *Meloidogyne incognita* in *Musa* germplasm. *Journal of Nematology*, *20*(1), 19–26.
- Trochez Solarte, J. D., Ruiz Erazo, X., Almanza Pinzon, M., & Zambrano Gonzalez, G. (2019). Role of microsatellites in genetic analysis of *Bombyx mori* silkworm: a review. *F1000Research*, *8*, 1424. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20052.1>
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, D., & Tenkouano, A. (2002). Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *104*(8), 1239–1245. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0802-3>
- Uma, S., Mustaffa, M. M., Saraswathi, M. S., & Durai, P. (2011). Exploitation of diploids in Indian banana breeding programmes. *Acta Horticulturae*, *897*, 215–224.
- Villardón, L. V. (n.d.). Introducción al análisis de cluster, 1–22.