

Evidencias moleculares de variantes somaclonales de caña de azúcar. Somaclones resistentes a la mancha de ojo

Ingrid Hernández, Mayra Rodríguez, Eduardo Canales y Orlando Coto.

Departamento de Bioplantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Apartado Postal 6714, La Habana, Cuba

Recibido: 19 de octubre de 2003. Aceptado: 5 de mayo de 2004.

Palabras clave: cultivo de tejidos vegetales, variación somaclonal, mancha de ojo, *Drechslera sacchari* S., marcadores moleculares, caña de azúcar.
Key words: plant tissue culture, somaclonal variation, eye spot disease, *Drechslera sacchari* S., molecular markers, sugar cane.

RESUMEN. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, en las que se incluye la variación somaclonal, han sido extendidas y actualmente, se utilizan como fuente alternativa para la producción de variabilidad útil para el mejoramiento vegetal. La mancha de ojo es una enfermedad de la caña de azúcar causada por el hongo patógeno *Drechslera sacchari* S. que ocasiona daños de interés a este cultivo, con pérdidas económicas de importancia en las áreas afectadas. Los marcadores del polimorfismo de ADN (marcadores moleculares) se han convertido en herramientas valiosas para los estudios genéticos en plantas. En el presente trabajo, se estudió la estabilidad molecular mediante RFLP y AFLP de plantas de caña de azúcar resistentes a la mancha de ojo obtenidas previamente a partir de una variedad muy susceptible, C 87-51, utilizada en la variación somaclonal y la selección *in vitro*. Los análisis moleculares realizados permitieron comprobar que luego de 20 años de obtenidos, los tres somaclones de caña de azúcar resistentes a la mancha de ojo, C Ce 83-1, C Ce 83-2 y C Ce 83-4, continúan mostrando patrones de ADN diferentes a la variedad que les dio origen. Los resultados permitieron detectar además, combinaciones de enzimas de restricción-sondas y de cebadores, que resultan de utilidad para iniciar los trabajos de mapeo genético en progenies resultantes de cruces entre somaclones y la variedad donadora. Se reportan adicionalmente, marcadores moleculares de grupos de diversidad e individuales para la identificación rápida y precisa de la variedad C 87-51 y los somaclones C Ce 83-1 y C Ce 83-4.

ABSTRACT. Plant tissue culture techniques, including somaclonal variation, have been refined to the extent that they are now used as an alternative resource in plant breeding applications. Eye spot disease is caused by *Drechslera sacchari* S. with seriously damage and severe economic problems to sugarcane at specific areas. Molecular markers have been very valuable to study genetic relations in plants. In this paper, molecular stability (RFLP and AFLP) of resistant sugarcane plants to *D. sacchari* (DS toxin) obtained previously by somaclonal variation and *in vitro* selection from the high susceptible variety C 87-51 were studied. Results demonstrated that the three sugarcane somaclones resistant to eye spot disease; C Ce 83-1, C Ce 83-2 and C Ce 83-4; obtained 20 years before, are still showing DNA pattern different to the original variety. Further results permit to detect probe and enzyme and primer combinations, useful to mapping studies in progenies of crosses between somaclones and the C 87-51. Useful group and individual molecular markers are also reported for the rapid identification of the C 87-51 and the somaclons C Ce 83-1 and C Ce 83-2.

INTRODUCCION

La regeneración de plantas mediante el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* a partir de células somáticas, debe concluir en la producción de clones fenotípica y genéticamente idénticos al material del que originalmente se derivan. Sin embargo, en muchos casos, una proporción de plantas regeneradas exhiben una variabilidad genética importante. Estos cambios genéticos fueron definidos como variación somaclonal.¹

Se ha determinado que son varios los factores que pueden influir en la aparición de plantas diferentes al genotipo donante, los que van desde las condiciones de crecimiento, incluidos los reguladores de crecimiento presentes en los medios de cultivo hasta el explante de partida.² Sin embargo, mediante este método es posible la recuperación de las plantas regeneradas y por tanto, la variación somaclonal constituye una fuente de variabilidad genética.³ La variación somaclonal ha permitido el desarrollo de diferentes líneas de plantas, constituyendo una fuente de variación útil para la agricultura.⁴

Las variaciones descritas incluyen cambios en el cariotipo, mutaciones génicas de los genomas nucleares y citoplasmáticos, inversiones, modificaciones en los cromosomas, reestructuraciones de genes y mutaciones no convencionales como amplificaciones y los transposones.⁵

El aprovechamiento de la variación somaclonal es relativamente común en especies vegetales, como cebada,⁶ frijol,⁷ trigo,⁸ guisante,⁹ avena,¹⁰ caña de azúcar,^{11,12} entre otras. Esta biotecnología se ha utilizado con eficiencia en la producción de plantas regeneradas con hábitos de crecimiento alterados, resistentes a enfermedades, estrés abiótico y otros caracteres de interés.

La mancha de ojo es una enfermedad de la caña de azúcar causada por *Drechslera sacchari* Subram. que ocasiona daños de interés a este cultivo, con pérdidas económicas de importancia en las áreas afectadas. Plantas de caña de azúcar resistentes al hongo patógeno producido por *D. sacchari* (toxina DS) fueron obtenidas a partir de una variedad muy susceptible^{11,12} y utilizando la variación somaclonal y la selección *in vitro*.

En los últimos años, se ha comenzado a establecer un sinergismo dinámico entre el cultivo de tejidos y la biología molecular. En este sentido, los marcadores del polimorfismo de ADN (marcadores moleculares) se han convertido en herramientas valiosas para los estudios genéticos en plantas y en algunos casos, están siendo ya empleados exitosamente en la elección de progenitores, en la selección¹³ y constituyen una alternativa potencialmente atractiva en la identificación de variedades.^{14,15}

El RFLP se ha utilizado con efectividad para estos fines en más de 60 especies vegetales.¹⁴ Actualmente, los AFLP y las secuencias marcadas de microsatélites ofrecen varias ventajas sobre el resto de los marcadores.¹⁶

Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar molecularmente a los somaclones resistentes a la mancha de ojo, determinar combinaciones de enzima-sonda y de cebadores para estudios de mapeo por RFLP y AFLP respectivamente.

MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron tres somaclones de caña de azúcar, resistentes a la enfermedad de la mancha de ojo, CCE 83-1, CCE 83-2 y CCE 83-4, obtenidos previamente¹² y la variedad donante C 87-51 muy susceptible a la enfermedad. Las muestras vegetales fueron suministradas por el Banco de Germoplasma de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Matanzas.

Análisis de RFLP

El ADN genómico total de cada genotipo se aisló a partir de hojas liofilizadas,¹⁷ y se digirió con las enzimas de restricción *HindIII*, *EcoRI* y *EcoRV*, según las recomendaciones del fabricante (Amersham). Las electroforesis para la separación de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa 0,8% en estabilizador TAE (Tris acetato 40 mol/L, EDTA 1 mol/L), y las transferencias de los fragmentos a membranas de nylon (Hybond N⁺, Amersham) se realizaron por el procedimiento alcalino (NaOH 0,4 mol/L). Se empleó el método de marcaje radioactivo de las sondas con ³²P y se utilizaron juegos de cebadores arbitrarios (Amersham).¹⁷ Los pesos moleculares se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular Raoul I (Appligene). Se utilizaron solo las bandas polimórficas, las cuales, se evaluaron de forma binaria considerando 0 como ausencia y 1 como presencia. La denominación de las bandas consta primero de la sonda que le da origen seguido del número de la propia banda de acuerdo con la posición en la radiografía de mayor a menor kilobases.

Se utilizaron las sondas de maíz UMC 10, UMC 85 y de caña de azúcar SSCIR 194 en combinación con las enzimas de restricción anteriores y caracterizadas por rendir un buen polimorfismo y calidad de marcaje en trabajos previos.

Análisis de AFLP

Para el análisis de AFLP, se utilizó el juego número I del Sistema de Análisis de AFLP, (Manual de Instrucciones de la compañía GIBCO BRL, Life Technologies). Los ADN genómicos fueron digeridos con una combinación de enzimas, una de corte raro (*EcoRI*) y otra de corte frecuente (*MseI*). Los fragmentos digeridos se acoplaron con adaptadores específicos de doble cadena. Luego, se realizaron ampliificaciones selectivas con cebadores específicos de una base selectiva (*EcoRI*+A, *MseI*+C) seguidas de otras con cebadores específicos de tres bases selectivas (*EcoRI*+ANN, *MseI*+CNN). Se utilizaron las combinaciones de cebadores E-ACC/M-CTG y E-AGC/M-CAA y se tuvo en cuenta la buena calidad de revelado mostrado por ellas en experimentos previos.¹⁸

Los ADN amplificados fueron desnaturalizados mediante la adición de un volumen igual de diso-

lución estabilizadora de formamida (formamida 98 % (v/v), 10 mmol/L EDTA, pH 8,0, 0,05 % bromo-fenol azul (p/v), y 0,05 % xilencianol (p/v); fueron calentados durante 5 min a 93 °C, colocados y enfriados en hielo rápidamente. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6,5 % en condiciones desnaturalizantes.

Los patrones de AFLP se visualizaron utilizando el método de tinción con plata de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Cat. # TMD005). Los geles se leyeron de forma visual y las bandas polimórficas se evaluaron de forma binaria con 1 y 0 para la presencia o ausencia respectivamente. La talla de las bandas se obtuvo por comparación con un patrón de peso molecular de 100 pb. La denominación de las bandas consta primero del número de la combinación de cebadores a la que pertenece y después de la propia banda en dicha combinación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización molecular mediante RFLP

Las siete combinaciones enzimáticas de sondas utilizadas (CES) produjeron un total de 33 fragmentos que mostraron buena calidad luego del marcaje y cuyo tamaño osciló desde 10 y los 20 kb, de este total de bandas, 13 mostraron polimorfismo entre los genotipos estudiados para un 39,4 %.

El análisis mediante RFLP realizado permitió detectar la presencia de los dos tipos de descriptores reportados por Cornide y col.,¹⁹ marcadores de grupo (G) e individuales (I) en los genotipos estudiados, sin embargo, resulta interesante el hecho de que estos dos tipos de marcadores están bien tipificados. Los marcadores de grupo corresponden solamente a fragmentos presentes solo en los somaclones, mientras que las bandas para la caracterización individual solo se observan en la variedad donante C 87-51, por lo que es imposible la identificación individual de las variantes somaclonales con las CES utilizadas en este trabajo (Tabla 1).

Resultados similares a los alcanzados en este trabajo han sido reportados por otros autores,²⁰ quienes después de estudiar más de 30 marcadores RFLP nucleares, mitocondriales y de cloroplasto, no detectaron variantes somaclonales en 63 plantas de paso regenera-

das a partir de callos embriogénicos.

Este resultado puede deberse, entre otros factores, al menor porcentaje de polimorfismo reportado para los marcadores RFLP, lo que ha sido extensamente revisado,^{16,21,22} y en segundo lugar, al limitado número de CES utilizadas. Adicionalmente, una combinación de ambos factores no debe descartarse, lo que puede limitar la utilidad de este tipo de marcador para la identificación varietal, en especial, en genotipos que se espera sean similares entre sí.

Se conoce además, de las limitaciones de los RFLP relacionadas con el tiempo necesario para la obtención de resultados el cual oscila entre los 7 y los 15 d en dependencia de la calidad de las hibridaciones y a ciertas dificultades técnicas.²³

No obstante, en caña de azúcar, los RFLP han resultado de utilidad para la identificación individual y de grupos de diversidad molecular de clones ancestrales y silvestres del complejo *Saccharum*,^{19,24-27} y constituye un requisito esencial para el inicio de los trabajos de mapeo genético en varias especies vegetales incluida la caña de azúcar. En este sentido, los marcadores RFLP reportados en el presente trabajo ofrecen las primeras combinaciones enzima-sondas para el inicio de esos trabajos en progenies derivadas del cruce entre cualesquiera de los somaclones y la variedad donadora.

Caracterización molecular mediante AFLP

Las dos combinaciones de cebadores utilizadas produjeron un total de 40 fragmentos polimórficos que mostraron buena calidad luego del revelado (Fig. 1), y cuyo tamaño osciló desde 89 hasta 270 pb, de este to-

tal de bandas 13 mostraron polimorfismo entre los genotipos estudiados para un 32,5 % de polimorfismo.

El análisis mediante AFLP realizado permitió detectar nuevamente la presencia de los dos tipos de descriptores reportados previamente,¹⁹ marcadores de grupo (G) e individuales (I) en los genotipos estudiados. De acuerdo con los resultados mostrados (Tabla 2) puede observarse nuevamente una tendencia a ser mayoritarios los marcadores para la identificación individual de la variedad donante C 87-51, sin embargo, mediante AFLP es posible identificar dos de los tres somaclones estudiados.

El resultado anterior es coincidente con el planteamiento de varios autores en relación con las potencialidades de los AFLP y de otros tipos de marcadores derivados de

estos para la identificación varietal.²⁸ En este sentido, otros marcadores obtenidos por amplificación han sido de gran utilidad como los RAPD para la caracterización molecular de somaclones de papa regeneradas a partir de protoplastos.²⁹

El análisis de agrupamiento realizado a partir de las bandas polimórficas independientes de ambos tipos de marcadores mostró la presencia de un solo grupo de diversidad formado exclusivamente por las variantes somaclonales con una estabilidad media (60,8 %), diferente a la variedad donante C 87-51. Se destaca además, la presencia de un subgrupo formado por los somaclones CCe 83-1 y CCe 83-4 con una estabilidad elevada (94,3 %) (Fig. 2).

Teóricamente, la regeneración de explantes a partir de tejidos debe resultar en la producción de clones

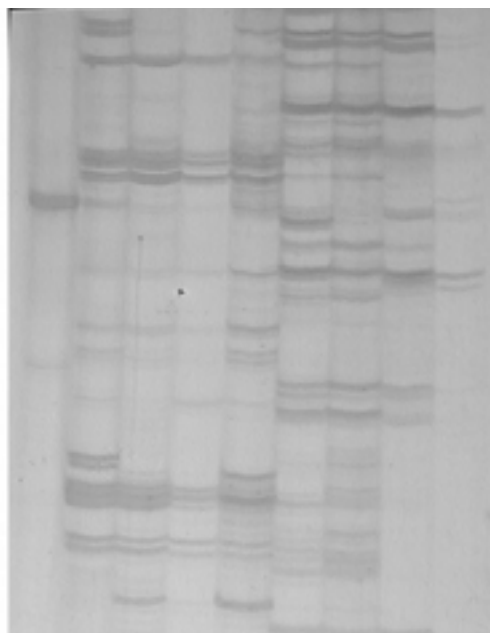


Fig. 1. Ejemplo de un AFLP parcial obtenido con las dos combinaciones de cebadores utilizadas. Los fragmentos oscilaron entre 89 y 270 pb.

Tabla 1. Bandas diferenciales individuales y de grupo obtenidas por RFLP de la variedad de caña de azúcar y sus somaclones.

Genotipo	Bandas RFLP diferenciales									
	U10H1	U85V4	S194I3	S194I4	S194I5	U10H3	U85H2	S194H4	U10V3	U10V4
C 87-51	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
CCe 83-1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
CCe 83-2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
CCe 83-4	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Peso molecular (kb)	4,8	4,3	6,0	5,1	4,8	3,3	5,3	3,7	5,6	4,8

■ ■ ■ Bandas diferenciales individuales.

⋮ ⋮ ⋮ Bandas diferenciales de los grupos de diversidad molecular.

U10H1, U10H3; U85V4; S194I3, S194I4, S194I5; U85H2; S194H4; U10V3, U10V4: fragmentos de las CES UMC 10-Hind III. UMC 85-EcoR V, SSCIR 194-EcoR I. UMC 85-Hind III. SSCIR 194-Hind III y UMC 10-EcoR V respectivamente.

Tabla 2. Bandas diferenciales individuales y de grupo obtenidas por AFLP de la variedad de caña de azúcar C 87-51 y sus somaclones.

Genotipo	Bandas AFLP diferenciales											
	H40	H41	H47	H48	H49	H59	H60	H63	H67	H68	H73	H52
C 87-51	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
CCe 83-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
CCe 83-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
CCe 83-4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
Peso molecular (pb)	168	166	106	105	104	200	195	183	140	135	100	93

■ ■ ■ Bandas diferenciales individuales. ···· Bandas diferenciales de los grupos de diversidad molecular.

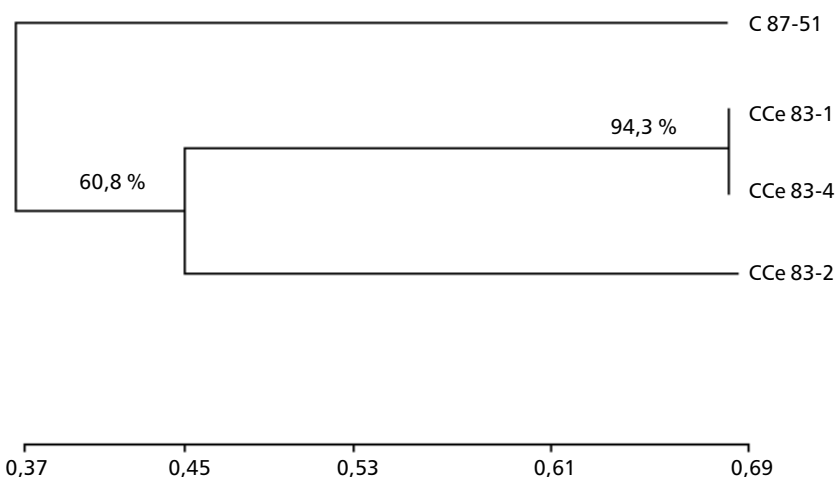


Fig. 2. Análisis de agrupamiento basado en los estimados de similitud genética de RFLP y AFLP.

similares a la planta donante, lo que se refiere a que deben ser idénticas genotípica y fenotípicamente a la planta donadora. En este sentido, los resultados moleculares presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de que durante las fases de cultivo *in vitro* ocurren anomalías cromosómicas que provocan la aparición de variantes en las plantas regeneradas.⁴

El comportamiento de estas variantes somaclonales de caña de azúcar, luego de 20 años de su obtención, demuestra que la variación somaclonal es capaz de proporcionar variaciones estables y de utilidad para el desarrollo agrícola.

Por otro lado, se demuestran las potencialidades de los AFLP para la identificación varietal a partir de la detección de tres fragmentos diferenciales que permiten identificar a dos de los somaclones. El CCe 83-4 se caracteriza por ser el único portador de los fragmentos H59 y H63 de 200 y 183 pb respectivamente, mientras que que el somaclón CCe 83-1 es el único portador del fragmento H73 de 100 pb.

Resulta interesante además, que para las CES y combinaciones de cebadores evaluadas en este trabajo, sea mayoritaria la presencia de fragmentos para la identificación individual con la detección de un solo marcador de grupo, en este caso, correspondiente a las variantes somaclonales y que los marcadores individuales detectados, excepto los AFLP mencionados anteriormente, correspondan a marcadores de la variedad C 87-51.

Los marcadores AFLP reportados aquí, al igual que las CES utilizadas, resultan de utilidad para futuros trabajos de mapeo en progenies derivadas de cruces entre somaclón y donante.

CONCLUSIONES

Los análisis de RFLP y AFLP realizados permitieron corroborar que luego de 20 años de obtenidos, los somaclones de caña de azúcar resistentes a la enfermedad de la mancha de ojo, continúan mostrando patrones de ADN diferentes a la variedad que les dio origen C 87-51. Se reportan marcadores molecula-

res de grupos de diversidad e individuales para la identificación rápida y precisa de los materiales estudiados, así como las combinaciones de enzimas de restricción *Hind* III, *EcoR* V y *EcoR* I con las sondas UMC10, UMC85 y SSCIR194, que resultan de utilidad para iniciar los trabajos de mapeo genético en progenies resultantes de cruces entre somaclones y la variedad C 87-51. De forma similar, se reportan las combinaciones de cebadores E-ACC/M-CTG y E-AGC/M-CAA para la saturación de mapas de marcadores moleculares resultantes de las progenies anteriores mediante AFLP.

BIBLIOGRAFIA

1. Larkin P. and Scowcroft W. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theor. Appl. Genet.** **60**, 197, 1981.
2. Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, **85**, 295-302, 1995.
3. Maribona R.H., Korneva S.B., Coto O., Díaz P, Ruiz A., Oliva O., Jorge H., Hector E, Acosta P.P., Acosta E. and Pedraza E. Obtención de somaclones de caña de azúcar de alto rendimiento agrícola mediante el cultivo de tejidos. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **24**, 10-14, 1993.
4. Leroy X.J., Leon K. and Branchard M. Plant genomic instability detected by microsatellite-primers. **Plant Biotechnology, Molecular Biology and Genetics**, **3**, 3458, 2000.
5. Peschke V.M. and Phillips R.L. Genetic variations of somaclonal variation in plants. **Advances in Genetics**, **30**, 41-75, 1992.
6. Bregitzer P and Poulson M. Agronomic performance of barley lines derived from tissue culture. **Crop Science, Madison**, **35**, 1144-1148, 1995.
7. Mohamed M.F., Coine D.P. and Read P.E.. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science, St. Joseph**, **118**, 158-162, 1993.

8. Guensi A.C., Mornhinweg D.W. and Johnson B.B. Genetic analysis of a grass dwarf mutation induced by wheat callus culture. **Theor. Appl. Genet.**, **84**, 952-957, 1992.
9. Cecchini E., Natali L., Cavallini A. and Durante M. DNA variations in regenerated plants of pea (*Pisum sativum* L.). **Theor. Appl. Genet., Berlin**, **84**, 874-879, 1992.
10. Dahleen L.S., Stuthman D.D. and Rines H.W. Agronomic traits variation in oat lines derived from tissue culture. **Crop Science**, **31**, 90-94, 1991.
11. Ramos Leal M. and Maribona R.H. Effect of DS toxin upon the permeability of sugarcane leaf and callus tissue. **Plant Breeding**, **107**, 242-247, 1991
12. Ramos Leal M., Maribona R.H., Ruíz A., Korneva S., Canales E., Dinkova T.D., Izquierdo F., Coto O. and Rizo D. Somaclonal variation as a source of resistance to eyespot disease of sugarcane. **Plant Breeding**, **115**, 37-42, 1996.
13. Donini P., Cooke R.J. and Reeves J.C. Molecular Markers in Variety and Seed Testing. In: Plant Genetic Engineering: Towards the Third Millennium, Arencibia A.D., Elsevier Science B.V., 27-34, 2000.
14. Cooke R.J. and Reeves J.C. Cultivar identification—a review of new methods. In: Encyclopedia of Seed Production of World Crops. Kelly A.F. and George R.A.T. John Wiley and Sons, London, 88-102, 1998.
15. Lee D., Reeves J.C. and Cooke R.J. DNA profiling and plant varieties registration: 2. Restriction Fragment Length Polimorphisms in varieties of oilseed rape. **Plant Varieties and Seeds**, **9**, 181-190, 1996.
16. Caetano-Anolles G. and Trigiano R.N. Nucleic acid markers in agricultural biotechnology. **AgBiotech News and Information**, **9**, 235-242, 1997.
17. Hoisington D. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory, Mexico, D.F., CIMMYT, 1992.
18. Rodríguez M., Hernández I., Coto O., Canales E. y Cornide M.T. RFLP and AFLP Polymorphism Analysis in Sugarcane Varieties. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **34**, 121-128, 2003.
19. Cornide M.T., Coto O., Calvo D., Canales E., Prada De F. and Pérez G. Molecular markers for the identification and assisted management of genetic resources for sugarcane breeding. **Plant Varieties and Seeds**, **13**, 113-123, 2000.
20. Shenoy V.B. and Vasil I.K. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue culture of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). **Theor. Appl. Genet.**, **83**, 947-955, 1992
21. Morell M.K., Peakall R., Appels R., Preston L.R. and Lloyd H.L. DNA profiling techniques for plant variety identification. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, **35**, 807-819, 1995.
22. Karp A., Seberg O. and Buiatti M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, **78**, 143-149, 1996.
23. Waugh R. and Powell W. Using RAPD markers for crop improvement. **Trends Biotech.**, **10**, 186-191, 1992.
24. Lu Y.H., D'Hont A., Walker D.I.T., Rao P.S., Feldmann P. and Glaszmann J.C. Relationship among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica**, **78**, 7-18, 1994.
25. Coto O., Cornide M.T., Perez G., Canales E., Ramos Leal M. and Leonard H. Diversidad molecular (RFLP) de clones de *Saccharum* spp. de interés para el mejoramiento cañero. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **30**, 201-205, 1999.
26. Glaszmann J.C. and D'Hont A. Análisis molecular de la biodiversidad del germoplasma en caña de azúcar. En: Biodiversidad y Biotecnología de la caña de azúcar. Ariel D. Arencibia y María T. Cornide. Elfos Scientiae, La Habana, Cuba, 25, 44, 1999.
27. Coto, O., Cornide M.T., Calvo D., Canales E., D'Hont A. and de Prada F. Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with markers. **Euphytica**, **123**, 121-130, 2002.
28. Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.B.T. and Powell W. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposons elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (SSAP). **Mol. Gen. Genet.**, **253**, 687-694, 1997.
29. Carrasco A., Ruiz de Galarreta J.J. and Ritter E. Caracterización morfológica, cariotípica y molecular de tres somaclones de *Solanum tuberosum* l. obtenidos mediante cultivo de protoplastos. **Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.**, **13**, 385-391, 1998.