

# Estabilidad genética de las plantas de banano (*Musa spp.*) micropropagadas con reguladores del crecimiento no tradicionales

✉ Humberto Izquierdo, María C González, Miriam de la C Núñez

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Inca  
Carretera a Tapaste, Km 3½ San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba  
✉ hioviedo@inca.edu.cu

## RESUMEN

Las técnicas citogenéticas y de marcadores moleculares (isoenzimas y ADN) son útiles para verificar la estabilidad genética de material obtenido por cultivo *in vitro*, pues en muchas ocasiones en las plantas micropropagadas brotan regenerantes anormales o variantes somaclonales de las variedades de origen. El objetivo de esta investigación fue evaluar la estabilidad genética de plantas de banano (*Musa spp.*) clon 'FHIA-18' (AAAB) obtenidas *in vitro*. Se cometieron análisis citogenéticos, isoenzimáticos y técnicas de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), luego de la fase de aclimatización de plantas propagadas *in vitro*, con un análogo de brasinoesteroides (Biobras-6-ABr) o una mezcla de oligogalacturonidos, cuyo grado de polimerización estaba entre 9 y 16 (Pectimorf-mOLG). Como control se emplearon plantas del cultivo *in vitro* que no tenían ABr ni mOLG; pero que contenían ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido 3-indolacético (AIA) o 6-bencilaminopurina (6-BAP), y plantas madre de esta variedad provenientes del campo. También se emplearon dos tratamientos adicionales: en uno, las plantas procedían del cultivo *in vitro* con el ABr en todas sus fases, y en el otro, se empleó la mOLG. Los resultados mostraron que estos tratamientos no indujeron variabilidad genética en los regenerantes, ya que el número de cromosomas de la especie se mantuvo constante ( $2n = 4x = 44$ ). Con las isoenzimas se obtuvieron 29 bandas y con los RAPD, 27 bandas; todas monomórficas.

**Palabras clave:** aclimatización, banano, estabilidad genética, reguladores del crecimiento

*Biotechnología Aplicada* 2014;31:18-22

## ABSTRACT

**Genetic stability of the micropropagated banana (*Musa spp.*) plants with non-traditional growth regulators.** Cytogenetic and molecular markers (isozymes and DNA) techniques are very important to monitor the genetic stability of the material obtained by *in vitro* culture, because in many occasions the micropropagated plants usually produce non-normal regenerating plants or somaclonal variants of the origin cultivars. The aim of this work was to evaluate the genetic stability of banana (*Musa spp.*) plants of the 'FHIA-18' (AAAB) clone obtained *in vitro*. The cytogenetic, isoenzymatic and RAPD analyses were carried out in plants at the late acclimatization phase and *in vitro* propagated with brassinosteroids analogues (Biobras-6-ABr) or oligogalacturonides mixture with polymerization grade between 9 and 16 (Pectimorf-mOLG). Plants cultured *in vitro* without ABr or mOLG treatment, but either under indolebutyric acid (IBA), indole acetic acid (IAA) or 6-bencil aminopurine (6-BAP), were used as controls, and field-grown mother plants of this cultivar. Two additional treatments were also used, one applied to plants cultured *in vitro* under ABr during all the developmental phases, and the other one under mOLG. The results showed that the ABr and mOLG did not induce genetic variability in the regenerants obtained, remaining constant the chromosomes number of the specie ( $2n = 4x = 44$ ). Twenty-nine bands were obtained with the isozymes and twenty-seven with RAPD, all monomorphic.

**Keywords:** acclimatization, banana, genetic stability, growth regulators

## Introducción

La organogénesis es uno de los métodos para la regeneración de plantas por cultivo *in vitro*. Se utiliza ampliamente en la micropropagación, en la transformación genética y en estudios relacionados con el desarrollo de plantas [1].

En la última década del siglo pasado se progresó en las investigaciones relacionadas con la genética vegetal, la biología molecular, el ciclo celular y la traducción de señales de las auxinas y las citoquininas [1, 2]. Se avanzó en el estudio de los aspectos morfológicos y fisiológicos de la organogénesis *in vitro* y en los mecanismos moleculares que les dan respuesta. Además se investiga, pero más lentamente, la relación entre las auxinas, las citoquininas y otras sustancias promotoras del crecimiento como los brasinoesteroides y sus análogos, así como los oligogalacturonidos [2-5].

En ocasiones, los reguladores del crecimiento de las plantas que se incorporan al medio de cultivo promueven cambios. Para la inducción de callos, con frecuencia se emplea la auxina sintética, conocida como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Sin embargo, es la principal responsable de la variación genética y epigenética de algunos tejidos [6], por lo que no es recomendable en los protocolos de micropropagación masiva de plantas. Cuando se utilizan las citoquininas como la zeatina, la kinetina y la 6-bencilaminopurina (6-BAP) en concentraciones elevadas en los medios de cultivo, también pueden ocurrir aberraciones cromosómicas [7, 8].

Los análogos de brasinoesteroides (ABr) y la mezcla de oligogalacturonidos (mOLG) se pueden utilizar como sustitutos de las auxinas y las citoquininas en

1. Zhang S, Lemaux PG. Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. *Crit Rev Plant Sci.* 2004;23(4):325-35.
2. Perilli S, Moubayidin L, Sabatini S. The molecular basis of cytokinin function. *Curr Opin Plant Biol.* 2010;13(1):21-6.
3. Benková E, Hejálko J. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol Biol.* 2009;69(4):383-96.
4. González-García MP, Villarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-García S, Russinova E, et al. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development.* 2011;138(5):849-59.

varios procesos biotecnológicos [9, 10]. En particular, estos reguladores del crecimiento no tradicionales se utilizan convenientemente en una u otra fase de la micropropagación de plátanos y bananos (*Musa* spp.). Se ha reportado que el Biobras (6-ABr) atenuó el estrés de las temperaturas elevadas en el banano 'FHIA-18' durante la fase de aclimatización [11] y favoreció la formación de raíces *in vitro* durante la fase de enraizamiento del plátano 'FHIA-21' [12]. Por otra parte, el Pectimorf (mOLG) redujo el tiempo de salida de los explantes del clon de plátano macho 'Sobrino' durante su establecimiento *in vitro* [13].

El crecimiento *ex vitro* de las plantas procedentes de los procesos de organogénesis o embriogénesis somática es el resultado de tratamientos durante la etapa de propagación *in vitro* [14, 15]. Sin embargo, la regeneración de muchas especies de plantas todavía no suele ser un proceso eficiente.

La aplicación de los ABr y sus análogos, y de la mOLG estimulan varios procesos de desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*, y disminuyen el estrés abiótico inducido por las técnicas de cultivo *in vitro* [10, 11, 16]. Según algunos autores [15], el éxito de la aclimatización en los plátanos y bananos (*Musa* spp.) depende de que las plantas puedan transitar de las condiciones heterotróficas o mixotróficas (mezcla de autotróficas con heterotróficas) al autotrofismo, proceso que está relacionado con las reservas que obtienen durante el cultivo *in vitro*.

La identificación de la variabilidad genética en las plantas obtenidas *in vitro* mediante marcadores morfológicos, si bien es la técnica más aceptada, no es la única que se emplea, por ser muy lenta. Hoy se precisan métodos más eficaces, como los citogenéticos [17], los isoenzimáticos [18] y los moleculares (por ejemplo, la amplificación aleatoria del ADN polimórfico o RAPD) [19], para evaluar la estabilidad genética de los regenerantes obtenidos.

Su combinación suele ser eficaz para evaluar la variabilidad genética de varios cultivos como plátanos y bananos (*Musa* spp.) [19, 20], mandarina (*Citrus reshesni* Hort. ex Tan.) [21], boniato (*Ipomoea batatas* L.) [22] y piña (*Ananas comosus* [Lindley] Coppens and Leal) var. *Bracteatus* [23], entre otros.

Sin embargo, no se conoce si el empleo de los reguladores del crecimiento no tradicionales (ABr y mOLG) en todas las fases de la propagación *in vitro* de las plantas y posteriormente en el cultivo *ex vitro*, pudiera inducirles variabilidad genética o no.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la estabilidad genética de las plantas de banano (*Musa* spp.) variedad 'FHIA-18' (AAAB) obtenidas por micropropagación *in vitro*, mediante la combinación de técnicas citogenéticas, isoenzimáticas y moleculares.

## Materiales y métodos

### Plantas de banano, técnicas de cultivo y tratamientos

Se utilizaron plantas de la variedad 'FHIA-18' (AAAB) que tenían 45 días de edad, procedentes de la fase de aclimatización, propagadas *in vitro* con varias concentraciones de los reguladores del crecimiento tradicionales ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido 3-indolacético (AIA) y 6-BAP; y los no tradicionales

análogo de brasinoesteroides (ABr) y mezcla de  $\alpha$ -1,4-oligogalacturonidos (Pectimorf-mOLG). Los no tradicionales se aplicaron solo durante la fase de aclimatización.

La formulación de ABr contiene como ingrediente activo el análogo espiroestánico de brasinoesteroides 25(R)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\alpha$ -espirostan-6-ona, conocida como Biobras-6 (Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba). La fórmula general de este compuesto es C<sub>27</sub>O<sub>5</sub>H<sub>42</sub>, y su masa molar de 446.606 g/mol. La mezcla conocida como Pectimorf (mOLG), con grado de polimerización entre 9 y 16, se obtuvo en el Laboratorio de Oligosacarinas (Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba), a partir de la pectina de la corteza de los frutos de lima persa (*Citrus latifolia* Tan), con una masa molar promedio de 2042 g/mol.

Durante el cultivo *in vitro* se realizaron los tratamientos siguientes: Control (establecimiento: AIB 0.015  $\mu$ mol/L + 6-BAP 17.77  $\mu$ mol/L; multiplicación: AIA 3.71  $\mu$ mol/L + 6-BAP 17.77  $\mu$ mol/L y enraizamiento: AIA 7.42  $\mu$ mol/L); ABr (establecimiento: 6-BAP 17.77  $\mu$ mol/L + ABr 0.02-0.01  $\mu$ mol/L; multiplicación: 6-BAP 17.77  $\mu$ mol/L + ABr 0.1-0.2  $\mu$ mol/L y enraizamiento: ABr (0.1  $\mu$ mol/L) y la mOLG (establecimiento: AIB 0.015  $\mu$ mol/L + mOLG 0.47  $\mu$ mol/L; multiplicación: 6-BAP 17.77  $\mu$ mol/L + mOLG 0.47-2.35  $\mu$ mol/L y enraizamiento: mOLG 2.35-4.70  $\mu$ mol/L).

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron sales previamente descritas [24], suplementadas con tiamina 0.30  $\mu$ mol/L, mioinositol 15  $\mu$ mol/L, sacarosa 87.642  $\mu$ mol/L y agar 6.5 g/L como agente gelificante (fase de establecimiento y multiplicación *in vitro*).

En la fase de aclimatización *ex vitro*, se evaluaron los tratamientos: T<sub>1</sub>, plantas madres provenientes del campo, vigorosas y sin síntomas visibles de enfermedades virales, fungosas o bacterianas (control); T<sub>2</sub>, plantas provenientes del cultivo *in vitro* (obtenidas con AIB, AIA y 6-BAP), las raíces de las vitroplantas se sumergieron en 0.1 % de Ridomil (producto comercial Ridomil MZ al 72 %, de acción sistémica y de contacto); T<sub>3</sub>, plantas obtenidas *in vitro* con ABr; y T<sub>4</sub>, plantas obtenidas *in vitro* con la mOLG. El primer tratamiento no se incluyó en el estudio citogenético de las plantas.

Antes de la plantación, las raíces de las plantas tratadas con ABr y la mOLG se sumergieron en las soluciones de ABr 0.2  $\mu$ mol/L y de la mOLG 0.47  $\mu$ mol/L: T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, respectivamente; y 15 días después de la plantación, las plantas se asperjaron con las mismas concentraciones de estos reguladores del crecimiento, a razón de 2 mL por vitroplanta.

La plantación se hizo en bandejas de poliestireno expandido de 70 alvéolos, cuyas dimensiones eran 5 × 5 × 5 cm (125 cm<sup>3</sup>), que contenían un sustrato compuesto por una mezcla en volumen de 75 % de materia orgánica (cachaza descompuesta), más 25 % de suelo ferralítico rojo compactado. Estas bandejas se transfirieron a condiciones semicontroladas, en una casa de cultivo tapado de malla de polipropileno al 30 % (densidad de flujos de fotones fotosintéticos 600  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s).

5. Creelman RA, Mullet JE. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell*. 1997;9(7):1211-23.

6. Von Arnold S. Somatic embryogenesis. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editors. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2008. p. 335-54.

7. Orbović V, Calović M, Vilorija Z, Nielsen B, Gmitter FG Jr, Castle WS, et al. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica*. 2008;161(3):329-35.

8. Rيسان A, Chennareddy S. Genotypic variation in the micropropagation of Sri Lankan *Exacum* hybrids. *J Am Soc Hort Sci*. 2004;129(5):698-703.

9. García D, Marrero MT, Cuba M, Núñez M. Efecto cualitativo de análogos de brasinoesteroides como sustitutos hormonales en la calogénesis de café (*Coffea canephora* variedad Robusta). *Cultivos Tropicales*. 1997;18(2):44-6.

10. Montes S, Aldaz JP, Cevallos M, Cabrera JC, López M. Uso del biorregulador Pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales*. 2000;21(3):29-31.

11. González-Olmedo JL, Córdova A, Aragón CE, Pina D, Rivas M, Rodríguez R. Effect of an analogue of brassinosteroid on FHIA-18 plantlets exposed to thermal stress. *InfoMusa*. 2005;14(1):18-20.

12. Jiménez FA, Ramírez D, Agramonte D. Use of Biobras-6 in micropropagation of 'FHIA-21'. *InfoMusa*. 2004;13(1):4-6.

13. Díaz BR, Héctor E, Torres A, Cabañas M, Garcés N, Izquierdo H, et al. Empleo de productos bioactivos cubanos como sustitutos de los reguladores del crecimiento en la propagación del plátano macho (AAB). I. Fase de establecimiento *in vitro*. *Alimentaria*. 2004;51(359):103-7.

14. Högborg KA, Bozhkov PV, Grönroos R, von Arnold S. Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scand J Forest Res*. 2001;16(4):295-304.

15. Aragón CE, Escalona M, Capote I, Pina D, Cejas I, et al. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa AAB*) growing in temporary immersion bioreactor (TIB) and during *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2005;41(4):550-4.

16. Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem*. 2009;47(1):1-8.

17. Xiqués X. Caracterización citogenética de la variabilidad en plantas. In: Cornide MT, editor. *Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas*. La Habana: Editorial Félix Varela; 2002. p. 67-91.

18. Lara RM, Florido M, Plana D, Moré O, González ME, Álvarez M, et al. Isoenzymatic analysis for detecting *in vitro* variability and/or stability of economically important crops. *Cultivos Tropicales*. 2003;24(3):39-47.

19. Martín KP, Pachathundikandi SK, Zhang CL, Slater A, Madassery J. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. 'Grande naine' and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2006;42(2):188-92.

El riego fue por microaspersión (2 kg/cm<sup>2</sup> y un caudal de 120 L/h), mediante un sistema Microjet®, con una frecuencia de 4 riegos al día durante 2 min cada uno, los primeros 7 días, para lograr una humedad relativa del 90 %.

#### Análisis citogenético radicular

Para el estudio del cariotipo se emplearon ápices radiculares provenientes de raíces de 1 cm de longitud. Estos se tomaron al azar al inicio de la fase de aclimatización (día 0) y al finalizarla (45 días), como describieron Román y Rodríguez Nodals [25].

Se seleccionaron al azar cinco plantas. Se contaron los cromosomas de 25 células por planta por tratamiento, con el empleo de un microscopio óptico (Olympus, Japón) con cámara fotográfica acoplada (Canon, Japón). Las mejores metafases se fotografiaron con una magnificación de 1000×.

#### Análisis isoenzimático

La preparación de los extractos para el análisis electroforético de las isoenzimas anhidrasa carbónica (AC), esterasas (Est), peroxidasas (POX) y polifenoloxidasas (PPO) se realizó según Román [26]. Se emplearon 5 g de hojas, que se maceraron en nitrógeno líquido; en tampón de extracción de bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 7.2. Se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min, a 4 °C en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Alemania). Posteriormente se filtraron con tela de gasa doble, se envasaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos se efectuaron en un sistema discontinuo en gel de poliacrilamida [27]. Para ello se empleó un gel separador del 10 % con tampón Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, y gel concentrador al 4 % con tampón Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8.

El tampón de la cubeta fue Tris 0.025 M-glicina 0.019 M, pH 8.3. El tiempo de corrida se determinó por el desplazamiento de la banda Kolrhauch, hasta aproximadamente 6 cm del inicio. Se utilizó una intensidad de corriente constante de 20 mA, en una cámara de electroforesis SE 260 Mini-Vertical (Hoefer®, Pharmacia Biotech, Alemania). En cada electroforesis se adicionaron 15 µL de extracto por pocillo.

Una vez efectuada la separación, se realizaron tinciones fitoquímicas específicas para los sistemas isoenzimáticos que se evaluaron: AC (E.C. 4.2.1.1) [28], Est (E.C. 3.1.1.1) [29], POX (E.C. 1.11.1.7) [30] y PPO (E.C. 1.10.3.1) [31].

#### Análisis molecular mediante la técnica de RAPD

Para la técnica de RAPD se empleó como material vegetal de partida plantas sometidas a cinco de los tratamientos, seleccionados al azar. Se utilizó la última hoja de las plantas, tras culminar la fase de aclimatización, midiendo desde la base del pseudotallo, y la hoja en la fase de "cigarro" de las plantas provenientes del campo, que no presentaban síntomas de enfermedades.

La extracción del ADN se efectuó según el protocolo de Dellaporta *et al.* [32]. Su calidad se constató por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % con tampón de corrida TBE 1× (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, pH 7.0), teñidos con bromuro de etidio

(5 mg/mL) y observados en un transiluminador (Bio-block Scientific, Francia). La concentración se estimó por la medición de la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro Ultrasepec Plus Spectrophotometer (Pharmacia LKB, Inglaterra). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 25 µL, que contenía: Tris-HCl 10 mM, pH 8.3; KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, gelatina 0.001 %, cada dNTP a 100 µM, 5 pmoles de cebador (Kits OPA y OPF; Operon Technologies, Alameda, California Inc.), 50 ng de ADN genómico y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega). Se emplearon seis cebadores arbitrarios: OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3'), OPA-10 (5'-GTGATCGCAG-3'), OPA-11 (5'-CAATCGCCGT-3'), OPA-13 (5'-GGCTGCAGAA-3'), OPF-04 (5'-GGTGATCAGG-3') y OPF-13 (5'-GGCTGCAGAA-3') [20, 33].

Para la amplificación se empleó un termociclador Progene (Techne, Estados Unidos), programado para 45 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 36 °C y 2 min a 72 °C, y un ciclo de 10 min a 72 °C. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en tampón de corrida TBE 1× (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, pH 7) y se contrastaron con bromuro de etidio (5 mg/mL) antes de observarse en un transiluminador de luz ultravioleta (Bioblock Scientific, Francia).

Las bandas en las plantas donantes y en las que procedían del cultivo *in vitro* se evaluaron de forma binaria por su presencia (1) o ausencia (0). Los resultados se expresaron en porcentaje de bandas monomórficas.

## Resultados y discusión

#### Análisis citogenético radicular

En el estudio del cariotipo, se verificó que la utilización de ABr y de la mOLG en todas las fases de la micropropagación del clon de banano 'FHIA-18' (AAAB), mantuvo constante el número de cromosomas: 2n = 4x = 44 (Figura 1).

Las variaciones de ploidía no suelen evidenciarse en más de 20 ciclos de cultivo *in vitro* durante dos años, mediante estudios combinados de citogenética y citometría de flujo. Esto se ha evidenciado al mantenerse constante el número de cromosomas (2n) de las variedades de banano 'Kluai Sa' (AA) y 'Kluai Leb Mue Nang' (AA) [34].

Los cambios cromosómicos se han observado en cultivos *in vitro* de *Fragaria* spp., especialmente en las plantas provenientes de callos y de células conservados *in vitro* por un periodo prolongado [35]. Las variaciones en el grado de ploidía, del cultivo *in vitro*, pueden resultar de la relación entre la constitución genética de la especie y la composición del medio de cultivo [36].

Luego del empleo de los reguladores del crecimiento ABr y mOLG en todas las fases de la micropropagación, no se detectaron mosaicos cromosómicos: 2n = 2x = 22 cromosomas (diploides) ni 2n = 3x = 33 cromosomas (triploides). Estos mosaicos cromosómicos se han descrito en la micropropagación acelerada de clones del género *Musa* spp. [37], y provocan inestabilidad genética.

20. Venkatchalam L, Sreedhar RV, Bhagyalakshmi N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2007; 43(3):267-74.

21. Hernández RM, Lara RM, Diosdado E, Cabrera JC, González C, Valdés M, *et al.* Evaluación de la actividad del Pectinorm en la embriogénesis somática de la mandarina 'Cleopatra' (*Citrus resini* Hort. ex Tan.) mediante marcadores isoenzimáticos. *Cultivos Tropicales.* 2007;28(4):25-31.

22. González O, Fernández A, Fraga Y, Pino B, Hernández MM, Silva JJ. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD en plantas de *Ipomoea batatas*. *Cultivos Tropicales.* 2007;28(2):39-43.

23. Santos MD, Buso GC, Torres AC. Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple (*Ananas comosus* var. 'Bractatus' (Lindley) Coppens and Leal) using RAPD markers. *Gen Mol Res.* 2008;7(4):1097-105.

24. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962;15(3):473-97.

25. Román MI, Rodríguez Nodals A. Estudios citogenéticos e implicaciones taxonómicas en ocho cultivares de plátano (*Musa* spp.). *Cienc Téc Agric Viandas Tropicales.* 1986;7(1):7-14.

26. Román MI. Estudio de la diversidad genética en accesiones de bananos y plátanos (*Musa* spp.) en Cuba. Tesis presentada en opción al Título de Doctor en Ciencias Biológicas [dissertation]. La Habana: Facultad de Biología, Universidad de La Habana; 2004.

27. Ornstein L. Disc electrophoresis I. Background and Theory. *Ann NY Acad Sci.* 1964;121:321-49.

28. Brewer GJ, Singh CF. An introduction to isoenzyme techniques. New York: Academic Press; 1970.

29. González C, González JA. Estudio de patrones para la lima Persa III. Caracterización isoenzimática. *Rev Cienc Técnica Agric.* 1981;4(2):102-8.

30. Iglesias L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica-bioquímica en soya (*Glycine max* Merrill). [dissertation]. Tesis de Doctorado. La Habana: Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez; 1986.

31. Guedes MEM, Rodríguez CJ Jr. Disc electrophoresis patterns of phenoloxidase from leaves of coffee cultivars. *Portugaliae Acta Biol Serie A.* 1974;13:169-78.

32. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep.* 1983;1(4):19-21.

33. Zambrano AY, Martínez G, Gutiérrez Z, Manzanilla E, Vicente-Villardón JL, Demey JR. Marcador RAPD asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* en *Musa*. *Interciencia.* 2007;32(11):775-9.

34. Srangsam A, Kanchanapoom K. Establishment of *in vitro* culture of *Musa* AA group 'Kluai Sa' and *Musa* AA group 'Kluai Leb Mue Nang' and the analysis of ploidy stability. *ScienceAsia.* 2007;33(4):437-42.

### Análisis isoenzimático

Los resultados del estudio isoenzimático de los sistemas evaluados para el ABr y para la mOLG fueron monomórficos y no indujeron variaciones con respecto al control; lo que sugiere que estos reguladores del crecimiento no influyeron en la estabilidad genética del material micropropagado (Figura 2).

En el sistema de la AC se definieron ocho bandas; en el sistema de las Est se visualizaron siete bandas; en el de las POX se observaron seis bandas (la banda del segundo y sexto sistema genético eran más gruesas) y en el de las PPO también se definieron ocho bandas. Estas bandas son propias del clon 'FHIA-18' (AAAB), del género *Musa*, características de las plantas con predominio del genoma *acuminata* [26]. Además, las Est y PPO se encuentran entre las isoenzimas más empleadas para la caracterización de especies vegetales, porque manifiestan elevados grados de reproducibilidad y de polimorfismo, particularmente en variedades del género *Musa* spp. Sin embargo, en esta investigación no se observó polimorfismo en los sistemas isoenzimáticos.

Otros autores han encontrado estabilidad completa en las plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) provenientes de callos, con diferentes concentraciones de los análogos de brasinoesteroides MH-5 y Biobras-6 y de la Pectimorf-mOLG con los sistemas isoenzimáticos POX, AC y fosfatasa ácida [18].

Los resultados en los sistemas isoenzimáticos (AC, Est, POX y PPO) para el banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18', no mostraron variabilidad genética, ya que las 29 bandas analizadas fueron monomórficas, lo que corrobora su uso apropiado en la determinación de la variabilidad y estabilidad genética de ese género, como recomiendan algunos autores [26]. Además se corroboraron los resultados del estudio citogenético.

### Análisis molecular mediante RAPD

De los dos kits que se analizaron, se seleccionaron cuatro cebadores, por la cantidad, calidad y reproducibilidad de las bandas amplificadas. Los más informativos fueron el OPA-10 y el OPF-13 que amplificaron ocho bandas cada uno, seguido del OPA-04 con siete bandas y el OPA-11, que amplificó cuatro bandas.

Los cuatro cebadores de secuencia arbitraria utilizados amplificaron 27 bandas: aproximadamente 7 bandas por cada cebador. Hubo coincidencia en el total de bandas para el donante de campo proveniente del cultivo *in vitro* y los regenerantes obtenidos con los reguladores del crecimiento (ABr y mOLG) en todas las fases de la micropropagación del híbrido 'FHIA-18'. Las bandas detectadas eran monomórficas (100 %), lo que indica que la utilización de ABr y la mOLG en todas las fases de la micropropagación, no ocasionó variabilidad en las plantas aclimatadas de este genotipo de banano.

Los estudios moleculares con RAPD en *Musa* spp. se emplean para la identificación de variedades, el mapeo genético de clones de interés y la localización de genes resistentes a las principales enfermedades que afectan estos cultivos [19, 33]. En esta investigación se utilizaron para detectar variantes somaclonales provocadas por el cultivo de tejidos en el género *Musa* spp. Otros grupos, como Harirah y Khalid [38], obtuvieron perfiles monomórficos, por lo que concluyeron que la

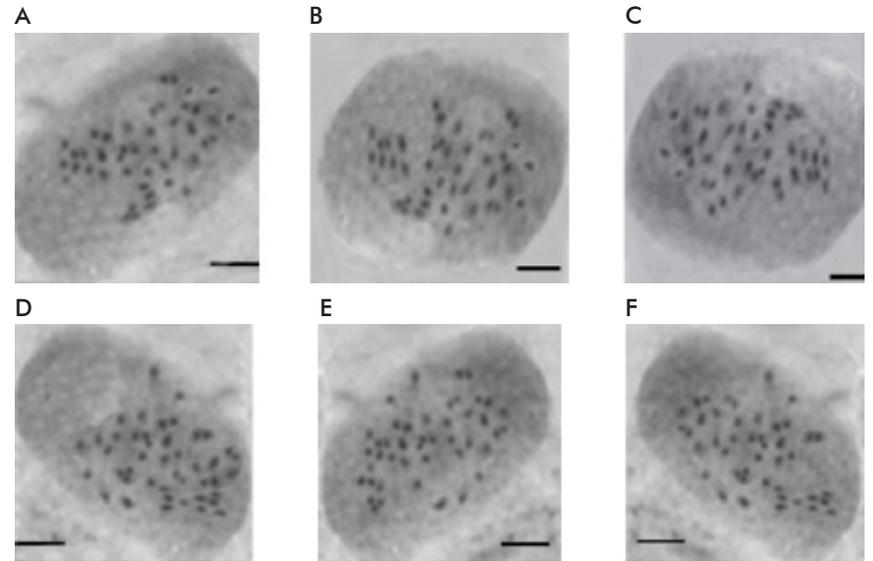


Figura 1. Células de plantas de banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18' (AAAB) en metafase mitótica en el tratamiento control (inicio: A y final: D), con el empleo de ABr (inicio: B y final: E) en todas las fases y de la mOLG (inicio: C y final: F) durante la aclimatación, con número de cromosomas  $2n = 4x = 44$ . La barra representa  $25 \mu\text{m}$  ( $1000\times$ ).

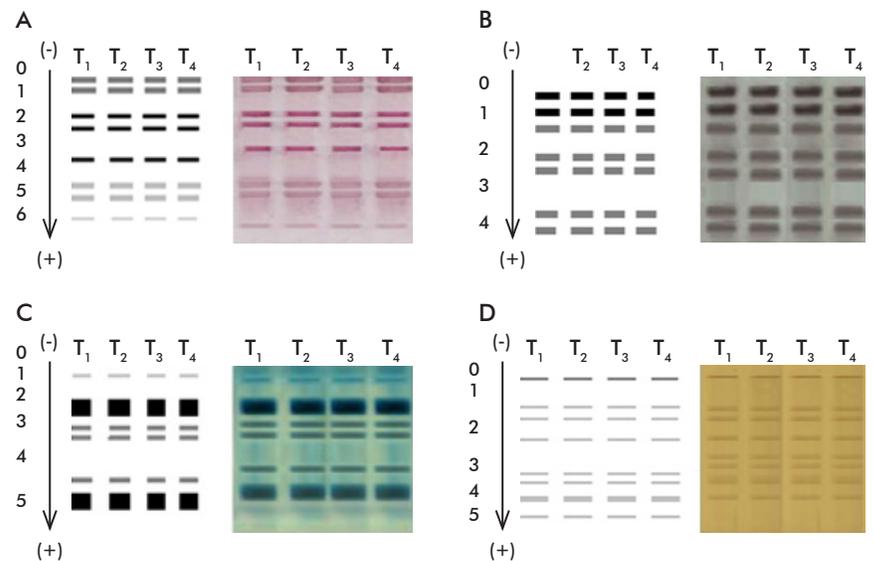


Figura 2. Evaluación isoenzimática de las plantas de banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18' (AAAB) obtenidas con el empleo de los análogos de brasinoesteroides (ABr) y de la mezcla de oligogalacturónidos (mOLG), mediante sistemas isoenzimáticos durante la fase de aclimatación. A) anhidrasa carbónica. B) esterazas. C) peroxidasas. D) polifenoloxidasas. Se aplicaron los siguientes tratamientos:  $T_1$ , plantas madre procedentes de campo - control;  $T_2$ , plantas obtenidas *in vitro* - control sin inmersión de las raíces de las plántulas durante 15 minutos antes de la plantación (I), ni aspersión foliar de las plántulas durante 15 días después de la plantación (AF);  $T_3$ , plantas obtenidas *in vitro* con I + AF de ABr ( $0.2 \mu\text{mol/L}$ );  $T_4$ , plantas obtenidas *in vitro* con inmersión + AF de mOLG ( $0.47 \mu\text{mol/L}$ ).

micropropagación de *Musa acuminata* cv. 'Berangan' a partir de flores masculinas no provoca variación somaclonal.

La combinación de dos técnicas moleculares para el estudio de la variación generada por las técnicas de cultivo *in vitro*, permite examinar un mayor porcentaje de sitios del genoma. En tal sentido, algunos investigadores han descrito la utilización de marcadores RAPD y secuencias repetidas intersimples (ISSR)

35. Hao YJ, Deng XX. Cytological and molecular evaluation of strawberry plants recovered from *in vitro* conservation by slow-growth. *J Hort Sci Biotechnol*. 2005; 80(5):588-92.

36. Bublyk EN, Adonin VI, Kunakh VA. Cytogenetic variability of cell lines of *Ungernia victoris* grown on nutrient media of different compositions. *Cytol Genet*. 2008;42(1):23-9.

para examinar la variación genética en plantas del banano (*Musa* spp. var. 'Nanjanagudu Rasabale' AA) micropropagadas durante 10 años [20]. Ellos obtuvieron patrones de bandas uniformes, y en el análisis de las muestras no se observaron bandas polimórficas; pese a que se incluyeron plantas con características morfológicas diferentes.

Sin embargo, otros autores han hallado un alto polimorfismo en los regenerantes provenientes del cultivo *in vitro* solo con el empleo de la técnica de RAPD en *Musa* spp. [19]. También se ha descrito un alto porcentaje de monomorfismo o total estabilidad genética en cultivos como *I. batatas* (L.) Lam. clon 'INIVIT B 93-1' [22], (*A. comosus* [Lindley] Coppens and Leal) var. *Bracteatus* [23] y en *Centaurea ulreia* Silva Pando [39]. También con esta técnica se informó un alto porcentaje de polimorfismo (93.19 %) en plantas medicinales [40].

Los resultados con los marcadores moleculares RAPD para las combinaciones de cebadores analizados, no indicaron variaciones genéticas intra ni inter-

poblacionales en las cuatro poblaciones de plantas de banano 'FHIA-18' estudiadas, con independencia de su origen (plantas madre provenientes del campo; cultivo *in vitro* con AIB, AIA y 6-BAP u obtenidas *in vitro* y *ex vitro* bajo tratamiento con ABr o mOLG, respectivamente).

## Conclusiones

Se comprobó la estabilidad genética de los regenerantes del clon de banano (*Musa* spp.) 'FHIA-18', tras el empleo de ABr y mOLG durante su propagación *in vitro* y *ex vitro*. Mediante las técnicas de citogenética, las isoenzimas y la RAPD se corroboró que el número de cromosomas de la especie se mantuvo constante y mostraron estabilidad. Ello se comprobó mediante las bandas idénticas en las plantas madre, las plantas obtenidas *in vitro* con los reguladores tradicionales y en aquellas obtenidas con los más modernos reguladores del crecimiento. El estudio permitió validar el empleo de ABr y de la mOLG en la micropropagación de este clon.

37. Zaffari GR, Peres LEP, Suzuki RM, Kerbauy GB. Plantas micropropagadas anormales de bananos: niveles endógenos de auxina, citoquininas e IAA-oxidasa. *MusaRama*. 2001;14(2):12.

38. Harirah AA, Khalid N. Direct regeneration and RAPD Assessment of male inflorescence derived plants of *Musa acuminata* cv. Berangan. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*. 2006;14(1):11-7.

39. Mallón R, Rodríguez-Oubiña J, González ML. *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ulreia*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2010; 101(1):31-9.

40. Tiwari KL, Jadhav SK, Kumar A. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker based genetic relationship study of medicinal plants collected from tribal region of Chhattisgarh, India. *Res J Biotech*. 2011;6(3):63-6.

Recibido en junio de 2013.

Aprobado en octubre de 2013.