

Tesis presentada en opción al Título Académico de
Master en Biotecnología Vegetal



Respuesta de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) transformadas con el gen de osmotina *ap24* al estrés hídrico

Autor: Lic. Leonardo Julio Moreno Bermúdez

Tutores: DrC. Borys Chong Pérez

DrC. Rafael Gómez Kosky

Dedicatoria

A las tres personas más importantes en mi vida (hoy):

Mis madres y mi hermana

Pensamiento

*Los mejores hombres no son aquellos que han esperado las oportunidades,
sino los que las han buscado y aprovechado a tiempo, los que las han asediado,
los que las han conquistado.*

Agradecimientos

¡Gracias!: Una palabra pequeña, ¡pero a veces en las cosas más pequeñas se guardan las cosas más grandes! Esta palabra es un ejemplo, abarca desde el gesto más sublime hasta la acción más compleja. Es humilde, sencilla, espontánea y noble, y está entre las cosas menos costosas y a la vez más valiosas que tenemos para ofrecer a quienes, en situaciones puntuales o a lo largo de nuestra vida, contribuyen a nuestro crecimiento espiritual, personal y profesional. (LJMB.

2/07/15)

Hoy quiero agradecer a todos aquellos que durante esta etapa que ya culmina, aportaron desde lo más sencillo hasta lo más complejo para llegar a este final que marca un nuevo comienzo.

En primer lugar a mi familia, las tres personas a las cuales dedico este trabajo, las más importantes para mí, de las que me acompañan hoy en la vida. Gracias por ser la fuerza para seguir adelante, para seguir andando y creciendo cada día más. Gracias por permitir quedarse atrás en ocasiones, para que yo pueda avanzar, gracias por su espera, por el estímulo, el aliento y el impulso que me dan día a día, gracias por ser, en una sola palabra, la “Vida”.

En segundo lugar quiero agradecer a dos personas que hoy físicamente no se encuentran conmigo, pero aun así siento y creo que no han dejado de acompañarme un solo momento desde que no están. Tengo la certeza de que, desde el lugar que sea, a cada momento conjugan todos los factores de una manera coordinada y perfecta para que todo salga a mi favor, incluso aquello que en un principio pienso que no es bueno, y que luego termina por serlo. Gracias porque sé que también me han hecho llegar así como lo he hecho, hasta este momento.

Y en tercer lugar quiero agradecer a todas aquellas personas que me ayudaron en esta etapa para hacer posible esto que culmina hoy:

Gracias a mis tutores Borys y Kosky, por ofrecerme a inicios del mes de Octubre del 2012, en una etapa muy especial para mí, la posibilidad de trabajar en este tema, del cual me adueñé desde el principio con ganas, con ímpetu, con entusiasmo, dedicación y entrega. Gracias por sus consejos, por guiarme, por enseñarme, por ayudar a que me abra paso en un mundo tan complejo como este de la investigación, y sobre todo, gracias por dejarme hacer en este marco lo que me gusta y me hace sentir realizado desde el punto de vista profesional “Ciencia”.

En las clases:

Gracias a todos los profesores de cada curso, que me dotaron de conocimientos muy valiosos, y que en todos los casos de alguna u otra manera pude, Y TUVE que integrar para hacer mi trabajo y para discutir mis resultados; todos me han hecho también crecer. Gracias Lourdes, Novisel, Idalmis, Raúl, Toni, Sinesio, Orelvis, Maroto, Borys, Kosky, María I, Michel, Leyanes y Yelenys (para esta última: ¡Como me has hecho madurar científicamente!)

Gracias a mis compañeros de curso: Rosa Elena, Amanda, Eylin, Lala, Carlos, Harold, Boris y Daniel por cada momento de intercambio, científico y jocoso.

En los laboratorios:

Gracias Mary, por estar siempre ahí, al pendiente de cada momento, de cada subcultivo, de cada experimento. Por tu ayuda hasta en lo más mínimo, por tus consejos, por tu experiencia!...

Gracias a todos quienes me ayudaron y aportaron algo, que por sencillo que fuese, es parte de esto que he sido capaz de hacer: Mayelin, Blanquita, Ale, Dámaris, Berkys, Anabel, Yenny, Mariana, Yudith, Lisvey, Yanet, Deivís. Por otro lado, Baby, Luis, Marilin.

Una frase, aunque no sea una acción, también ayuda, lo que vale es la intención. La frase?: "Cualquier cosa en lo que te pueda ayudar, o lo que te haga falta...". Las personas?: Tatiana, Mayra, Mileidy, Amado, Yury, Dely, Dailé.

Gracias a Alejandro, por integrarse a mi familia y a veces asumir funciones que me correspondían, acciones que se tradujeron en ganancia de tiempo para adelantar en este trabajo.

Gracias a mis estudiantes de pregrado Catherine y Lucía. Me prepararon, también me hicieron adelantar, y sin saberlo me retaron.

Gracias a Cary y a Marta por el apoyo logístico.

Agradecimientos especiales:

A Mollineda, !!!!Si no fuera por ese espectrofotómetro, ¿Qué sería de esta tesis?!!!!, pero más que un "simple" equipo, valen las acciones, gracias por su paciencia, experiencia, cordialidad, y la que más me llegó, su confianza.

A mi oponente, Milady, por sus consejos y ayuda práctica y metodológica, y por esa oponencia! que aún no me ha hecho pero que sé que me va a hacer!!!

A yudi, Por ese interés, apoyo emocional, material, positivismo y compañerismo, sobreexpresado ya en esta etapa final.

Y ya casi al final, porque sé que, por lo que representan, no me van a cuestionar estar en este renglón, gracias Mayre, gracias Yane, por todo el apoyo incondicional y por mucho más...

Finalmente, A este IBP, que un día fue mi sueño (!!hace 14 años atrás!!) y hoy es una realidad. Que me lo ha dado TODO para hacer este trabajo, recursos humanos y materiales. Cómo no agradecerle?!!!

Y si alguien se me quedara, además de esta sencilla palabra: "Gracias", le ofresco otra más humilde aún: "Disculpa!"

A todos

MUCHAS GRACIAS!!!

Los plátanos y bananos son cultivos tropicales y subtropicales sensibles a la sequía. Mediante la transformación genética se pueden obtener nuevos genotipos tolerantes a este factor. Para ello, en otros cultivos se han empleado exitosamente genes que codifican para proteínas responsables del ajuste osmótico de las células bajo condiciones de déficit hídrico, clasificadas como osmotinas y acuaporinas. En plátanos y bananos se han transformado varios cultivares para obtener tolerancia a la sequía, sin embargo no se han encontrado referencias al respecto en el cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA), uno de los más comercializados a nivel mundial. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la respuesta al estrés hídrico *in vitro* en líneas transgénicas de banano cv. 'Grande naine' transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Se empleó como agente osmoestresante el polietilenglicol 6000 a una concentración de 30 g l⁻¹ en medio de cultivo semisólido de multiplicación. Se emplearon dos líneas transgénicas, y como controles susceptibles plantas sin transformar del propio cultivar. A su vez se utilizaron como controles tolerantes plantas de los cultivares 'Manzano' (*Musa* AAB) y 'Pelipita' (*Musa* ABB). A los 30 días se evaluaron variables indicadoras de estrés morfológicas (altura de la planta y número de brotes por explante), fisiológicas (masa fresca, masa seca y contenido relativo de agua) y bioquímicas (contenido de clorofilas totales, prolina, peróxido de hidrógeno y malondialdehído). Las líneas transgénicas toleraron el estrés mejor que las no transformadas, respondiendo de forma similar al cultivar 'Pelipita' considerado como tolerante. Esto se pudo comprobar por que no se afectó la masa seca y el contenido de clorofilas en una de ellas, y en la otra además de no afectarse el contenido de clorofilas, ocurrió un menor daño a las membranas celulares manifestado por bajos contenidos de peróxido de hidrógeno y malondialdehído.

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Generalidades sobre el cultivo.....	4
2.1.1. Origen y distribución.....	4
2.1.2. Taxonomía y diversidad genética.....	5
2.1.3. Importancia económica y alimentaria.....	6
2.1.4. Características del cultivar ‘Grande naine’.....	7
2.2. Estrés en plantas.....	8
2.2.1. Estrés abiótico y tipos.....	8
2.2.1.1. Efectos del estrés abiótico en las plantas.....	9
2.2.1.2. Respuestas de las plantas al estrés abiótico.....	10
2.2.2. Estrés hídrico en plantas <i>in vitro</i>	12
2.2.2.1. Agentes inductores del estrés hídrico <i>in vitro</i>	13
3.3. Relación de plátanos y bananos con el estrés hídrico.....	14
3.3.1. Mejoramiento genético de plátanos y bananos para lograr tolerancia a estrés hídrico.....	14
3.3.1.1. Transformación genética de plátanos y bananos para la obtención de genotipos tolerantes al estrés hídrico.....	15
3.3.1.1.1. Genes empleados y cultivares transformados.....	16
3.3.2. Selección <i>in vitro</i> de plátanos y bananos con tolerancia al estrés hídrico.....	17
3.4. Indicadores de tolerancia al estrés hídrico.....	18
3.4.1. Indicadores morfológicos.....	19
3.4.2. Indicadores fisiológicos.....	19
3.4.2.1. Contenido relativo de agua (CRA) y pérdida de agua total (PAT).....	19
3.4.2.2. Pérdida de electrolitos y conductividad eléctrica de las membranas.....	20
3.4.2.3. Masa fresca (MF) y masa seca (MS).....	20
3.4.3. Indicadores bioquímicos.....	21
3.4.3.1. Prolina.....	21
3.4.3.2. Clorofilas.....	21
3.4.3.3. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	22
3.4.3.4. Malondialdehído (MDA).....	24
3.4.3.5. Enzimas relacionadas con el estrés oxidativo.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Procedimientos Generales.....	26
Material vegetal.....	26
Procedencia de las líneas transgénicas.....	26
Medios de cultivo.....	27
Condiciones de trabajo.....	27
Condiciones de cultivo.....	28
Diseño experimental y procesamiento estadístico.....	28
3.1. Determinación de indicadores de estrés hídrico morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.....	29
3.1.1. Indicadores morfológicos (altura de la planta y número de brotes por explante).....	29
3.1.2. Indicadores fisiológicos.....	29
3.1.2.1. Masa fresca (MF) y masa seca (MS).....	29

3.1.2.2. Contenido relativo de agua (CRA).....	29
3.1.3. Indicadores bioquímicos.....	30
3.1.3.1. Contenido de prolina.....	30
3.1.3.2. Contenido de clorofilas totales (a+b).....	31
3.1.3.3. Contenido de malondialdehído (MDA).....	31
3.1.3.4. Contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Determinación de indicadores de estrés hídrico morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.....	33
4.1.1. Indicadores morfológicos.....	33
4.1.2. Indicadores fisiológicos (Altura de la planta y número de brotes por explante).....	38
4.1.2.1. Masa fresca (MF) y masa seca (MS).....	38
4.1.2.2. Contenido relativo de agua (CRA).....	38
4.1.3. Indicadores bioquímicos.....	46
4.1.3.1. Contenido de prolina.....	46
4.1.3.2. Contenido de clorofilas totales (a+b).....	49
4.1.3.3. Contenido de malondialdehído (MDA).....	52
4.1.3.4. Contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	55
5. CONCLUSIONES.....	61
6. RECOMENDACIONES.....	62
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUCCIÓN

La sequía constituye uno de los más grandes desafíos a los que se enfrenta la agricultura para la producción de alimentos a nivel mundial, esta impone a las plantas un estrés osmótico que afecta negativamente su crecimiento y desarrollo, lo cual trae como resultado una disminución en la productividad (Henry *et al.*, 2011).

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) son sensibles a este factor abiótico, ya que se desarrollan en las regiones tropicales y subtropicales y están adaptados a buenas condiciones de humedad. Estos cultivos constituyen el alimento fundamental para más de 400 millones de personas alrededor de todo el mundo, se cultivan en más de 130 países, con una producción aproximada de 144 592 009 toneladas anuales (FAOSTAT, 2015).

En las últimas décadas como consecuencia del cambio climático se ha percibido un incremento en la temperatura global del planeta, lo cual ha provocado la incidencia de sequías prolongadas en las zonas dedicadas al cultivo de plátanos y bananos. Esta problemática ha llevado a la comunidad científica a pensar en la necesidad de obtener nuevos genotipos tolerantes al déficit hídrico, ya que para la producción de estos cultivos el agua constituye uno de los factores más limitantes (Vanhove *et al.*, 2012).

Los plátanos y bananos que poseen valor comercial son generalmente cultivos estériles, poliploides y se propagan vegetativamente (Ravi *et al.*, 2013), por esta razón para obtener plantas mejoradas para un carácter en particular no resulta conveniente utilizar las técnicas de fitomejoramiento clásico. Las técnicas biotecnológicas constituyen una alternativa para solucionar esta limitante, y dentro de ellas la transformación genética es una opción atractiva porque permite insertar en el genoma de la planta, genes con una función conocida y obtener plantas en un menor tiempo que por las vías tradicionales.

Entre los genes usados para lograr tolerancia al estrés hídrico en varios cultivos de interés agrícola se destacan aquellos que codifican para proteínas clasificadas como acuaporinas,

dehidrinas y osmotinas (Bae *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012; Annon *et al.*, 2014). Estas proteínas intervienen en el ajuste osmótico de las células sometidas a condiciones de déficit hídrico, facilitan el transporte de agua y otras pequeñas moléculas a través de las membranas biológicas, con lo cual la planta puede tolerar el estrés (Xu *et al.*, 2014).

En plátanos y bananos se han obtenido a través de la transformación genética plantas que expresan alguna de las proteínas mencionadas y han resultado tolerantes a condiciones de escasez de agua. Por ejemplo, Shekhawat *et al.* (2011) obtuvieron plantas de cultivar de banano 'Rasthali' (*Musa* AAB) tolerantes a la salinidad y a la sequía en condiciones *in vitro*, a través de la expresión de un gen que codifica para una dehidrina. También Sreedharan *et al.* (2013) obtuvieron plantas transgénicas del mismo cultivar, tolerantes a estrés hídrico y al calor, a través de la expresión de un gen de acuaporina.

El cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa acuminata* Colla, grupo AAA, subgrupo Cavendish) está considerado como el cultivar más importante a nivel mundial (ProMusa, 2014). Este, cultivar según Ravi *et al.* (2013) es altamente susceptible a la sequía y sin embargo no se han encontrado referencias en la literatura científica sobre su mejoramiento genético con el propósito de lograr en él tolerancia a factores abióticos.

Chong-Pérez (2012) obtuvo líneas de plantas transgénicas de 'Grande naine' transformadas con el gen *ap24* de *Nicotiana tabacum* L. que codifica para una osmotina, para la obtención de resistencia a la enfermedad foliar Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), sin embargo no se ha probado en ellas la tolerancia al déficit hídrico.

Por otro lado, el polietilenglicol 6000 (PEG-6000) es uno de los agentes osmoestresantes más usados para simular el estrés hídrico *in vitro* (Rai *et al.*, 2010). En *Musa* spp. autores como Shekhawat *et al.* (2011) y Bidabadi *et al.* (2012) lo han empleado en otros cultivares ('Rasthali' y 'Berangan' (*Musa* AAA)), sin embargo no se conocen que variables pudieran ser utilizadas para

detectar tolerancia a la sequía *in vitro* con el uso del PEG-6000 en las líneas de plantas transgénicas de 'Grande naine' transformadas con el gen *ap24*.

Teniendo en cuenta la problemática anterior, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

"Mediante la determinación de variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas indicadoras de estrés hídrico, se podría determinar en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) transformadas con el gen de osmotina *ap24*, la tolerancia al estrés hídrico inducido con PEG-6000 en el cultivo *in vitro*."

Para dar cumplimiento a la misma se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la respuesta al estrés hídrico, en plantas *in vitro* de líneas transgénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) que portan el gen de osmotina *ap24*.

Objetivos específicos

- 1- Determinar variables morfológicas indicadoras de tolerancia, en plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' transformadas con el gen *ap24*, sometidas a estrés hídrico inducido con polietilenglicol 6000.
- 2- Determinar variables fisiológicas y bioquímicas indicadoras de tolerancia, en plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' transformadas con el gen *ap24*, sometidas a estrés hídrico inducido con polietilenglicol 6000.

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades sobre el cultivo

2.1.1. Origen y distribución

El origen del género *Musa* ha sido ampliamente debatido por muchos autores quienes han propuesto diferentes teorías al respecto. Belalcázar (1991) plantea que el género se originó en la península malaya en Asia, donde existían las especies *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla que al cruzarse entre sí dieron origen a todas las variedades de plátanos y bananos comestibles conocidas en América.

Por otra parte, Robinson (1996) plantea que varios diploides de *M. acuminata* tuvieron su origen en el sureste de Asia y las regiones occidentales del Pacífico, donde mediante cruzamientos naturales originaron híbridos triploides partenocárpicos con esterilidad femenina y frutos comestibles. Estos triploides fueron seleccionados, propagados y distribuidos como cultivo alimentario y junto con los cultivares diploides llevados a áreas más secas como India y Filipinas. Allí, por hibridaciones interespecíficas con la especie *M. balbisiana* desarrollada naturalmente en estas regiones, se originó el resto de los bananos y plátanos que se conocen con genomas de ambas especies.

También en la India o en las islas de Oceanía ubican el origen del plátano la mayor parte de los naturalistas según López (1989), debido a que aparece en pinturas rupestres de cavernas posiblemente en los años 300 y 400 a.n.e. Para este autor muchas variedades cultivadas pertenecen a especies nativas del noreste de la India.

Acerca de la distribución de los bananos comestibles fuera de Asia, Robinson (1996) plantea que pudo haber sido desde Indonesia hasta Madagascar cruzando el Océano Índico; una vez en Madagascar introducidos al este de África, Zaire y posteriormente a la región Oeste del continente africano. Los portugueses se encargaron de introducir el plátano desde África hacia las Islas Canarias poco después de 1402, y Fray Tomás de Berlanga lo llevó a Santo Domingo

en América en el año 1516 (Simmonds, 1966); de ahí fue introducido en Cuba según López (1989), y luego pasó al resto del continente americano.

2.1.2. Taxonomía y diversidad genética

Desde la primera clasificación científica del género *Musa* realizada por varios autores también se ha tratado su ubicación taxonómica de diferentes maneras. Según Cronquist (1988), el género pertenece a la familia *Musaceae* incluida en el orden *Zingiberales* (*Scitaminales*), que se sitúa dentro de la subclase *Zingiberidae*, perteneciente a la clase *Liliopsida* de la división *Magnoliophyta* (monocotiledóneas).

La familia *Musaceae* incluye dos géneros: *Ensete* y *Musa*. El primero está representado por especies de uso fundamentalmente ornamental que no representan cultivares de fruto comestible (Champion 1969); el segundo a su vez, se divide en cuatro secciones según Sandoval y Müller (1999): *Callimusa*, *Australimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*.

A la sección *Eumusa*, con número básico de cromosomas $n=11$, pertenecen las musáceas comestibles, que usualmente se dividen en dos grupos: plátanos y bananos, y que surgieron a partir de las dos especies silvestres diploides ($2n=22$) incluidas dentro de esta sección: *M. acuminata* y *M. balbisiana*, con genomas son representados con las letras A y B respectivamente. De esta manera, la ploidía y el genomio de cada cultivar están representados con la letra A para indicar la procedencia a partir de *M. acuminata* y con la B para la de *M. balbisiana* (Sandoval y Müller, 1999).

Los bananos comestibles son aquellos que solamente tienen en su genoma el aporte genético de *M. acuminata* (AA) (banano). Esta especie adaptada a regiones húmedas, fue sometida por el hombre durante muchos años a procesos de cruzamiento y selección, con ello se originaron otros cultivares diploides comestibles partenocárpicos o con semillas estériles (Simmonds, 1966).

A partir de los cultivares AA, por restitución cromosómica durante la meiosis, surgen los triploides AAA (Simmonds, 1987), grupo al cual pertenece la mayoría de los bananos que se comercializan, y dentro del que se incluyen los subgrupos: Gros Michel, Red, Green Red y Cavendish; a este último pertenece entre otros, el tipo Gigante, y dentro de él se incluye el cultivar 'Grande naine' (Simmonds, 1966).

Por otra parte, los plátanos comestibles se originaron por el cruzamiento natural entre los cultivares de banano AA y AAA, con el silvestre *M. balbisiana* (BB) (plátano), adaptado a suelos más secos, y por tanto más tolerante a la desecación y con mayor valor nutritivo y resistencia a enfermedades. Según Simmonds (1987) tales cruzamientos produjeron híbridos diploides ($2n=22$) (AB), triploides ($3n=33$) (AAB, ABB) y tetraploides ($4n=44$) (AAAB, AABB), cuya presencia en su genoma de las características genéticas de *M. balbisiana*, contribuyó a que se difundieran a un mayor número de regiones en el mundo. Stover y Simmonds (1987) refieren además la existencia del tetraploide ABBB. Todo lo anterior, refleja la gran diversidad genética que se presenta en el género *Musa* en la naturaleza.

2.1.3. Importancia económica y alimentaria

Los bananos y plátanos son un alimento primario para más de 400 millones de personas en Asia, África y América Latina, son componentes importantes de la dieta humana en casi todos los países del mundo, ya sea como alimento cocido o como fruta fresca (Marín *et al.*, 2002). Estos cultivos de manera unida constituyen el cuarto cultivo más importante después del arroz, el maíz y el trigo en valores de toneladas producidas (Afza *et al.*, 1996), de manera independiente el plátano ocupa el segundo lugar después de la naranja (*MusaDoc*, 2000), y los bananos constituyen la cuarta fruta de mayor producción mundial después de las uvas, los cítricos y las manzanas (Surender *et al.*, 2013).

La industria de plátanos, además de generar empleo directo e indirecto en las comunidades involucradas en la producción y comercialización; ha sido un factor importante para el comercio

y la exportación, no sólo en los países tradicionales del Caribe y América Latina, sino también en algunos países de Asia y África que le han permitido mejorar la economía de sus naciones.

Los plátanos y bananos están considerados como una buena fuente de potasio y vitaminas A, B1, B2 y C, además contienen un alto contenido de vitamina B6 con lo cual contribuyen a aliviar el estrés y la ansiedad; son utilizados también en los manejos agrícolas pues brindan sombra a otros cultivos como el cacao y café (*MusaDoc*, 2000).

2.1.4. Características del cultivar 'Grande naine'

Este cultivar es un triploide que solamente tiene genoma acuminata, se ubica en el subgrupo Cavendish con grupo genómico AAA. Según Pérez (1994), presenta una estabilidad genética entre un 0.0-80 %.

Su pseudotallo es de porte relativamente bajo, cilíndrico, de una altura entre 2,0-3,0 m y diámetro aproximado de 50 cm, medido a un metro de la superficie del suelo en el momento de aparecer la inflorescencia.

Las hojas en su estado adulto son de color verde mate con manchas pardo-negruzcas en el haz y color verde claro hacia el envés, con presencia de cera en ambas superficies. El nervio central es verde amarillo y tiene ligeras tonalidades rosadas; el pecíolo es grueso, corto y posee borde rojizo que se prolonga hacia todo el limbo. Los retoños son abundantes, cerosos y presentan muchas hojas que luego desaparecen.

La inflorescencia es pendulada, la pámpana es aovada, donde sus bellotas son de color morado con cera y brácteas deciduas. El número de manos de las flores femeninas está entre ocho y catorce con doble hilera.

La infrutescencia es ligeramente troncónica. Los frutos son de pedúnculo largo y delgado; con una forma curva, y color amarillo verdoso al madurar.

La distribución de este cultivar es a escala mundial y predomina entre los bananos cultivados con fines comerciales y de exportación. Entre las ventajas que ofrece este cultivar se destacan los

altos rendimientos, altos índices de cosecha, un intervalo de emergencia-floración y floración-madurez fisiológica de 196 y 122 días respectivamente, y que realiza su ciclo productivo en 318 días. Además la altura promedio del pseudotallo de 2,5 m le confiere mayor resistencia al viento y facilita las labores agronómicas y de cosecha (Soto, 1985).

En Cuba, antes de 1990 se cultivaba a todo lo largo y ancho del país, pero su producción disminuyó paulatinamente por la incidencia a partir de ese mismo año de la Sigatoka Negra. Además de ser susceptible a enfermedades fúngicas, es altamente susceptible al estrés abiótico causado por factores como la salinidad y la sequía que provocan un déficit hídrico en la planta y disminuye los niveles de productividad. (Ravi *et al.*, 2013)

2.2. Estrés en plantas

Las plantas son organismos sésiles que no pueden moverse de un lugar a otro en busca del ambiente más adecuado para su crecimiento y desarrollo, y por ello no pueden escapar de las situaciones de estrés medioambiental. Según Tadeo y Gómez-Cárdenas (2008) el concepto de estrés en el contexto de la fisiología vegetal implica, la presencia de un factor externo a la planta provocado por un medio ambiente cambiante, que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo.

A lo largo de su ciclo vital las plantas están expuestas a un gran número de condiciones o factores estresantes, que pueden agruparse en bióticos y abióticos. El estrés biótico es causado por la acción de los seres vivos como animales, otras plantas y los denominados agentes patógenos (bacterias, hongos, virus y viroides), el estrés abiótico por su parte es causado por una serie diversa de factores medioambientales que pueden por lo general actuar de manera conjunta.

2.2.1. Estrés abiótico y tipos

El estrés abiótico dependiendo de la naturaleza del agente causal, puede dividirse en físico y químico. Entre los físicos se encuentra la sequía, la salinidad (en su componente osmótico), las temperaturas extremas (calor, frío, congelación), la excesiva o insuficiente irradiación, la anaerobiosis producida por encharcamiento o inundación, el estrés mecánico producido por el

viento o la excesiva compactación del suelo, y el inducido por heridas o lesiones. El estrés químico está causado por la salinidad (en su componente iónico o tóxico), por la carencia de elementos minerales y por los contaminantes ambientales como el dióxido de azufre (SO₂), los óxidos de nitrógeno (NO_x), los compuestos clorofluorocarbonados (CFC), el ozono (O₃) y los metales (Tadeo y Gómez-Cárdenas, 2008).

Según estos autores, de todos los recursos que la planta necesita para crecer y desarrollarse, el agua es el más importante y limitado; de acuerdo con esto, dentro de todos los tipos de estrés ambientales a los que las plantas pueden estar expuestas, el más importante es el estrés hídrico ya que este está ocasionado precisamente por un déficit de agua en los tejidos vegetales.

En el estrés hídrico se incluyen el estrés por salinidad (en su componente osmótico), y el estrés por sequía. La salinidad está dada por un incremento de solutos (sales) en el agua del suelo o del medio en el que se desarrolla la planta, cuando esto ocurre se reduce el potencial hídrico de ese medio, y las plantas experimentan dificultades para absorber agua, esta deficiencia por tanto trae como resultado un estrés hídrico en la planta (Tadeo y Gómez-Cárdena, 2008). Por otro lado, el estrés por sequía se define, según Deikman *et al.* (2012), como cualquier situación en la cual la cantidad de agua disponible para la planta es menor que la cantidad de agua requerida para sostener al máximo el crecimiento y la productividad. Según Vinocur y Altman (2005) la salinidad y la sequía son las causas primarias de las pérdidas agrícolas a nivel mundial.

2.2.1.1. Efectos del estrés abiótico en las plantas

Los estreses ambientales como la sequía, salinidad, elevada iluminación y temperaturas extremas influyen en el crecimiento y productividad de las plantas (Müller y Munné-Bosch, 2015). Estos factores dañan procesos vitales como la fotosíntesis y la síntesis de proteínas, lo cual resulta en una disminución del crecimiento y producción de biomasa. También se producen alteraciones en el balance hormonal, y en los procesos de oxidación/reducción que resultan en daños al ADN y a proteínas, y además a los lípidos de las membranas celulares mediante el

proceso conocido como lipoperoxidación. (Munns y Tester, 2008; Mittler *et al.*, 2011; Munné-Bosch *et al.*, 2013).

Las alteraciones en los procesos oxidación/reducción que causan estos daños a las diferentes biomoléculas y componentes de las células vienen dadas por el incremento en ellas de las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Díaz *et al.* (1999) señalan que este incremento conduce a que se genere estrés oxidativo dado porque los mecanismos de generación de las ROS superan la capacidad de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Chai *et al.* (2005) plantean que muchas enzimas relacionadas con la eliminación de intermediarios producidos por el metabolismo del oxígeno se incrementan a nivel celular como consecuencia del estrés hídrico, precisamente para combatir el daño que genera el estrés oxidativo como uno de los mecanismos de respuesta.

2.2.1.2. Respuestas de las plantas al estrés abiótico

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones de constante déficit hídrico (Nilsen y Orcutt, 1996). Muchas de estas adaptaciones están relacionadas con una mayor capacidad de tomar agua o con un uso más eficiente de este recurso.

Las condiciones ambientales en las cuales las plantas se desarrollan son percibidas por los distintos órganos, y esta información se transmite internamente mediante la modulación de la síntesis de señales, fundamentalmente hormonas que activan las respuestas de desarrollo y crecimiento vegetativo (Talón *et al.*, 1991; Zeevaart *et al.*, 1993). Vidal (2010) plantea que las plantas son capaces de si las condiciones ambientales se vuelven desfavorables, reprimir las respuestas de crecimiento y desencadenar mecanismos de protección y defensa que comprometen el desarrollo, y aseguran la supervivencia de la planta bajo condiciones ambientales adversas.

De manera general, Talón y Gómez-Cárdenas (2008) plantean que las plantas responden ante una situación de estrés (abiótico o biótico) en cuatro fases: la primera es la Fase de alarma, en la cual se activan los mecanismos defensivos de los que dispone la planta para hacer frente al estrés, esta activación conduce a la acomodación del metabolismo celular a las nuevas condiciones, a la activación de los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada y a la expresión de las adaptaciones morfológicas adecuadas. La segunda fase es la Fase de resistencia, en la que los cambios que se producen permiten a la planta alcanzar un nuevo estado fisiológico óptimo, si la situación de estrés se mantiene durante un tiempo excesivo, la capacidad de resistencia se agota y la planta detiene nuevamente sus funciones. Si esto ocurre la planta entra entonces en la tercera fase denominada Fase de agotamiento, que culmina con la muerte de la planta si la condición de estrés no desaparece a tiempo. Si el estrés cesa, las funciones fisiológicas de la planta pueden regenerarse y esta puede alcanzar un nuevo estado fisiológico óptimo para las condiciones presentes; esta última fase se denomina Fase de regeneración.

Los principales mecanismos fisiológicos para responder al estrés están relacionados con respuestas plásticas como modificaciones en la época de senescencia, mantenimiento de la estabilidad de las membranas celulares y de los orgánulos, y cambios en la elasticidad de la pared celular (Chinnusamy *et al.*, 2005; Stepanova y Alonso, 2005).

Otras respuestas emitidas por las plantas en condiciones de déficit hídrico son la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008), y además el cierre de los estomas que son las estructuras responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Según Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (2007) a nivel celular y molecular también se desencadenan respuestas al estrés hídrico, una de las principales es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos o solutos compatibles con el funcionamiento

celular, síntesis de proteínas con función protectora, factores de transcripción y enzimas antioxidantes, cuestión que ya se abordó en el acápite anterior.

2.2.2. Estrés hídrico en plantas *in vitro*

El estrés hídrico es un fenómeno que afecta a las plantas de manera natural en las condiciones en las que se desarrolla (*in vivo*), pero también se puede inducir bajo condiciones controladas ya sean *ex vitro* o *in vitro*.

Como consecuencia del aumento de la sequía, las temperaturas, y la salinización de los suelos en las últimas décadas, desde hace varios años se ha estado trabajando en la obtención de variedades y/o cultivares tolerantes a estos factores en plantas de interés agrícola que son sensibles al déficit de agua. En muchos de los estudios que persiguen este propósito, antes de probar la tolerancia de las plantas de interés en el campo, las pruebas se realizan en condiciones de cultivo *in vitro*, en primer lugar porque se plantea que existe una correlación entre las respuestas de las plantas *in vivo* y a nivel celular (Mohamed *et al.* 2000), y en segundo lugar, porque muchas de las técnicas empleadas para la obtención de variedades y/o cultivares tolerantes a la sequía tienen en común el uso de la biotecnología, que lleva implícito el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos. Además, este tipo de selección es menos costosa tanto desde el punto de vista económico, como de esfuerzos humanos, y consume menor cantidad de tiempo y material vegetal que las pruebas de selección realizadas en condiciones de campo (Deikman *et al.*, 2012).

Bidabadi *et al.* (2011), plantean que la selección *in vitro* para la tolerancia al estrés hídrico ha sido empleada en numerosos cultivos o plantas de interés agrícola como arroz (*Oriza sativa* L.), papa (*Solaun tuberosun* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), almendras (*Prunus amygdalus* L) y plátanos y bananos. (*Musa* spp.)

Todos estos estudios tienen en común el empleo de un agente selectivo adicionado a los medios de cultivo en los cuales crecen las plantas *in vitro*. Si las plantas son capaces de resistir

favorablemente la presión de selección ejercida por el agente empleado, lo cual se determina por la evaluación de variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas indicadoras de estrés, entonces se puede concluir que son tolerantes al factor evaluado.

2.2.2.1. Agentes inductores del estrés hídrico *in vitro*

Para inducir el estrés hídrico en condiciones *in vitro* han sido empleados varios agentes denominados “osmoestresantes”. Todos ellos presentan como característica común que al ser incorporados a los medios de cultivo provocan un descenso en el potencial hídrico de estos, como consecuencia el potencial de solutos se hace más negativo, y esto deviene en una mayor dificultad por parte de la planta para absorber agua, ocasionando el déficit hídrico en la misma. (Rai *et al.*, 2010)

Como agente inductor de estrés hídrico por salinidad, y para seleccionar plantas tolerantes a este factor en la fase de cultivo *in vitro*, el Cloruro de sodio (NaCl) es usualmente el más utilizado; en cambio, para la selección *in vitro* de plantas tolerantes al déficit hídrico provocado por sequía son empleados varios agentes: PEG, manitol, sorbitol y sacarosa. De ellos el PEG es el más utilizado en la mayoría de los casos ya que aquellos que presentan un peso molecular elevado son solutos no penetrantes a las células vegetales (Ravi *et al.*, 2011), de todos los PEGs empleados con estos fines, el que más se encuentra referenciado en la literatura científica es el PEG-6000.

Las concentraciones de PEG utilizadas para la selección a la sequía en condiciones de laboratorio están en dependencia del peso molecular de esta sustancia, del medio en el que se utilice y del cultivo o la especie en la cual se trabaje. Así por ejemplo, Tai *et al.* (2011), para la selección *in vitro* de plantas de maíz tolerantes a la sequía emplearon PEG-6000 a una concentración de 160 g l⁻¹ en solución de nutrientes Hogland; una concentración un poco menor (150 g l⁻¹) fue usada por Parkhi *et al.* (2009) con el mismo propósito en *N. tabacum* L. sin embargo en otros cultivos como plátanos y bananos las concentraciones empleadas son mucho menores, cuestión que será analizada posteriormente.

3.3. Relación de los plátanos y bananos con el estrés hídrico

Los plátanos y bananos al ser cultivos que se desarrollan en las regiones tropicales y subtropicales son sensibles al déficit hídrico, ya sea inducido por sequía o salinidad (Robinson, 1996). Según Van Asten *et al.* (2011), estos cultivos necesitan por lo menos 25 mm de agua por semana, y para mantener una productividad óptima requieren de precipitaciones anuales de 2000-2500 mm uniformemente distribuidas a lo largo del año, cuando las condiciones de riego son limitadas la sequía para ellos constituye una de las principales causas de las pérdidas en los rendimientos agrícolas.

Aunque son cultivos a los cuales les afecta la escasez de agua, los cultivares con genoma "B" son más tolerantes a este tipo de estrés abiótico que aquellos en los que su genoma se basa solamente en el genotipo "A". En particular, los cultivares de plátanos con genomas "ABB" son más tolerantes a la sequía y otros estreses abióticos que otros cultivares con otros genotipos (Ravi *et al.*, 2013).

3.3.1. Mejoramiento genético de plátanos y bananos para lograr tolerancia a estrés hídrico

Debido a la importancia que representan estos cultivos a nivel mundial como fuente de alimentación, desde hace varios años se ha estado trabajando en la obtención de genotipos tolerantes a factores abióticos en particular la salinidad y la sequía.

Para contar con plantas tolerantes a un carácter en particular en otros cultivos se recurre a las técnicas de fitomejoramiento clásico que permiten la obtención de nuevas variedades o cultivares, a partir de cruzamientos entre plantas con caracteres deseados y la posterior selección de las progenies en campo.

Los plátanos y bananos que poseen valor comercial son generalmente cultivos estériles, poliploides y se propagan vegetativamente (Ravi *et al.*, 2013). Según este autor hay cultivares entre los cuales, para la obtención de plantas tolerantes al déficit hídrico, pueden ser usadas las

técnicas de fitomejoramiento, sin embargo desarrollarlas resulta complicado y demora períodos de tiempo muy largos por las características fenológicas de estos cultivos. En su lugar, se recurre a técnicas biotecnológicas que resuelven esta limitante y además permiten la obtención de plantas en un menor tiempo que por las vías tradicionales. Otra ventaja es la posibilidad de la selección *in vitro* antes de evaluar las plantas en condiciones de campo, cuestión que ya fue tratada en el acápite 2.2.1.1.: “Estrés hídrico en plantas *in vitro*”, del presente capítulo.

Entre las herramientas biotecnológicas a las cuales se ha recurrido con el objetivo de obtener plantas de plátanos y bananos que toleren condiciones de escasez de agua, están la inducción de mutaciones con agentes químicos y la transformación genética. Sobre la primera, en la literatura consultada solo se ha encontrado un estudio (Bidabadi *et al.*, 2011); estos autores usaron como agente mutagénico el etil metano sulfonato (EMS) en meristemos apicales de los cultivares de banano ‘Berangan Intan’ y ‘Berangan’ ambos del grupo AAA. En este caso las líneas de plantas obtenidas por este método mostraron una mayor capacidad para resistir el estrés al que fueron impuestas en condiciones *in vitro* con PEG-6000, corroborado a través de la evaluación de variables morfológicas, fisiológicas y moleculares indicadoras de estrés.

Además de este trabajo, los demás que se han encontrado utilizan como vía para el mismo propósito la transformación genética, basado en una de las ventajas de esta técnica que es la introducción en las plantas de genes que presentan una función conocida.

3.3.1.1. Transformación genética de plátanos y bananos para la obtención de genotipos tolerantes a estrés hídrico

Varios son los estudios en los cuales se han transformado genéticamente diferentes cultivares de plátanos y bananos con el objetivo de obtener plantas que toleren condiciones de sequía y también de salinidad.

3.3.1.1.1. Genes empleados y cultivares transformados

En diferentes cultivos de interés agrícola se han usado genes responsables de la inducción de procesos celulares que permiten a las plantas tolerar el déficit hídrico a través de la expresión de proteínas que actúan directamente en el ajuste osmótico de las células ante el estrés. También a través de la expresión de enzimas de rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de compuestos osmoprotectores o en diferentes procesos morfogénéticos. Por ejemplo, Uga *et al.* (2013) transformaron plantas de arroz con el gen *deeper rooting 1* de este mismo cultivo, envuelto en la elongación celular de las raíces. Mediante este método los autores referidos obtuvieron plantas transgénicas de arroz con raíces más largas que las no transformadas y toleraron condiciones de estrés hídrico en campo, por tener la capacidad de absorber agua en capas más profundas del suelo.

Por otro lado Annon *et al.* (2014) obtuvieron plantas de zanahoria (*Daucus carota* L.) tolerantes a la sequía a través de la expresión del gen de una proteína incluida dentro del grupo de las osmotinas. El papel de estas proteínas fue informado por primera vez por Sing *et al.* (1989), a partir de su descubrimiento en suspensiones celulares de tabaco sometidas a estrés salino con NaCl. Entre las funciones de las osmotinas está participar en el ajuste osmótico de las células sometidas a condiciones de déficit hídrico. Además, desempeñan un importante papel en la resistencia contra enfermedades fúngicas (Abad *et al.*, 1996), por eso se les incluye en la Clase 5 de las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR, del inglés *pathogenesis-related*).

En plátanos y bananos los genotipos tolerantes al estrés hídrico que se han obtenido a través de la transformación genética, han resultado de la introducción en varios cultivares de genes que codifican para proteínas que como las osmotinas tienen la función de osmoregular las células (acuaporinas); también mediante la expresión de otras proteínas que permiten combatir el estrés oxidativo generado por un déficit de agua (dehidrinas y enzimas que detoxifican las células de los radicales libres). Por ejemplo, Shekhawat *et al.* (2011) transformaron plantas de plátano cv.

'Rasthali' con el gen *MusaDNH-1* que codifica para una dehidrina y al realizar las evaluaciones a estas plantas en condiciones *in vitro* observaron que podían tolerar el estrés, a diferencia de las plantas no transformadas; esto se pudo corroborar por la presencia de mayores contenidos relativos de agua, y resultar menos dañadas por el estrés oxidativo. Por otra parte, Sreedharan *et al.* (2013) transformaron plantas de plátano, también del cultivar 'Rasthali', con el gen *MusaPIP1;2* de banano cv. Karibale Monthan (*Musa* ABB), este gen codifica para una proteína de tipo acuaporina. Las plantas transgénicas en este caso mostraron mayor tolerancia que las no transformadas a estrés por calor, sequía y salinidad.

Por otra parte Rustagi *et al.* (2014), transformaron plantas del cultivar de banano 'Matti' (*Musa* AA) con el gen *AhSIPR10* de maní (*Arachis hypogaea* L.) que codifica para una proteína PR y las plantas transformadas mostraron tolerancia también a condiciones de sequía en la fase de cultivo *in vitro*.

Shekhawat *et al.* (2013) obtuvieron de igual manera en el cultivar de plátano 'Rasthali' plantas transgénicas tolerantes a factores abióticos como el calor, la sequía y la salinidad a través de la expresión en ellas del gen *MusabZIP53* de *M. balbisiana*, el cual codifica para un factor de transcripción (*bZIP*) de rutas metabólicas relacionadas con la respuesta al estrés abiótico.

A pesar de que la transformación genética de plátanos y bananos con el objetivo de lograr tolerancia a factores abióticos ha sido realizada en varios cultivares, hasta el momento no se han encontrado referencias sobre el empleo de esta técnica en cultivares del subgrupo Cavendish (genotipo AAA). En este subgrupo se incluyen los bananos que poseen mayor valor comercial a nivel mundial, siendo uno de ellos el cultivar 'Grande naine' (ProMusa, 2014), en el cual tampoco se han encontrado estudios referidos al tema.

3.3.2. Selección *in vitro* de plátanos y bananos con tolerancia al estrés hídrico

Como ya ha sido mencionado en el acápite 2.2.1.1.: "Estés hídrico en plantas *in vitro*", esta selección ofrece grandes ventajas comparada con la que se realiza en el campo. En plátanos y

bananos, este método representa una gran importancia por las características reproductivas de estos cultivos abordadas también con anterioridad.

La selección *in vitro* de plátanos y bananos tolerantes al estrés hídrico, como en otros cultivos, tiene la característica de ser realizada con el uso de agentes osmoestresantes. En este sentido han sido empleado el manitol (Shekhawat *et al.*, 2013; Rustagi *et al.*, 2014) y con mayor frecuencia el PEG. Las concentraciones de este último, usadas para la selección, varían en dependencia de su peso molecular y de las características del cultivar con el cual se trabaje en relación al déficit hídrico. En comparación con otros cultivos mencionados, en plátanos y banano las concentraciones de PEG comúnmente empleadas no son muy elevadas, por ejemplo Bidabadi *et al.* (2011) utilizaron 30 g l⁻¹ de PEG-6000 en los cultivares 'Berangan Intan' y 'Berangan'. Shekhawat *et al.* (2011) por su parte, usaron 20 y 50 g l⁻¹ del mismo osmoestresante en el cultivar 'Rasthali', pero en este caso el PEG usado fue de un mayor peso molecular (8000). En el cultivar de banano 'Grande naine', Moreno-Bermúdez *et al.* (2014) con una concentración de PEG-6000 de 30 g l⁻¹, lograron determinar variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que se afectaban como consecuencia del estrés, en las plantas sometidas al mismo en comparación con las crecidas en condiciones normales.

3.4. Indicadores de tolerancia al estrés hídrico

Los indicadores que se utilizan para detectar en las plantas tolerancia o resistencia a estrés de tipo abiótico y biótico respectivamente, están determinados por el conocimiento que existe sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos que rigen el crecimiento y desarrollo de estos organismos, y que se ven afectados por estos tipos de estrés. Por ejemplo, si se conoce que con el estrés hídrico se afectan la absorción de agua, la fotosíntesis, y la integridad de las membranas celulares; la determinación del contenido de agua en los tejidos, de moléculas relacionadas con el mecanismo fotosintético, y moléculas relacionadas con los daños a las membranas celulares respectivamente, constituyen indicadores de tolerancia de una planta ante una situación de

déficit de hídrico. Como ya se ha explicado en acápites anteriores, las plantas sometidas a estrés por sequía reaccionan modificando su morfología, fisiología y las reacciones bioquímicas que ocurren a nivel celular. Teniendo en cuenta lo anterior las variables o indicadores que se evalúan en estudios de tolerancia este tipo de estrés se ubican tres grupos: morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

3.4.1. Indicadores morfológicos

La determinación de indicadores morfológicos está dada fundamentalmente porque se conoce que con el estrés hídrico se reduce el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ehsanpour y Razavizadeh, 2005), el tamaño y la expansión de las hojas (Kallarackal *et al.*, 1990) y las raíces crecen más profundo como mecanismo para absorber agua a mayores profundidades en el suelo (Ravi *et al.*, 2103). Teniendo en cuenta estas afectaciones que también constituyen mecanismos de tolerancia a la sequía los indicadores morfológicos más comúnmente empleados son: la altura de las plantas (Husaini y Abdin, 2008; Parkhi *et al.*, 2009; Baloglu *et al.*, 2012; Vanhove *et al.*, 2012), el vigor y número de brotes por explantes en el caso de las plantas *in vitro* (Bidabadi *et al.*, 2011; Bidabadi *et al.*, 2012; Mahmood *et al.*, 2012) y la longitud de las raíces (Husaini y Abdin, 2008; Parkhi *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014;).

3.4.2. Indicadores fisiológicos

Los indicadores fisiológicos que se han evaluado en plantas para detectar tolerancia a la sequía se basan fundamentalmente en procesos relacionados con la cantidad de agua presente en los tejidos vegetales, y la producción de biomasa, aunque también se determinan otros que se relacionan con daños a estructuras celulares.

3.4.2.1. Contenido relativo de agua (CRA) y pérdida de agua total (PAT)

El CRA es uno de los indicadores fisiológicos más empleados, según Milburn *et al.* (1990) esta variable es la proporción de agua presente en tejidos vegetales en el momento de tomar la muestra para su determinación, con respecto a la que existe luego de que han sido totalmente hidratados, expresado en porcentaje. El CRA da medida de la cantidad de agua máxima que son

capaces de absorber los tejidos y ha sido empleado por varios autores (Mahmood *et al.*, 2012; Surendar *et al.*, 2013; Sreedharan *et al.*, 2013).

La PAT está relacionada también con el estado hídrico de las plantas, da medida de la cantidad de agua que pueden retener los tejidos vegetales, determinada a partir de la cantidad de agua que son capaces de perder, y puede ser indicadora de procesos como la transpiración (Valentovic *et al.*, 2006).

3.4.2.2. Pérdida de electrolitos y conductividad eléctrica de las membranas

Ambos indicadores se utilizan para medir los daños que ocurren a las membranas celulares como consecuencia del estrés oxidativo. Se basan en la determinación por conductimetría de la cantidad de iones presentes en una solución, que inicialmente era agua desionizada, luego de hacer flotar en ella fragmentos de tejido vegetal por una cantidad de tiempo determinado. Su interpretación se basa en que a mayor cantidad de iones presentes en la solución, mayor daño pudo ocurrir en las membranas celulares de los tejidos evaluados (Sreedharan *et al.*, 2013). Se ha usado para estimar este tipo de daños en plantas de maíz (*Zea mays* L.) (Valentovic *et al.*, 2006), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Ahmad *et al.*, 2010), algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Parkhi *et al.*, 2009) y banano (Rustagi *et al.*, 2014).

3.4.2.3. Masa fresca (MF) y masa seca (MS)

La MF constituye una medida del contenido de agua que puede tener una cantidad determinada de tejido vegetal, órgano o planta completa, mientras que la MS solamente constituye la biomasa producida por la planta, pues de ella se excluyen el agua y otros compuestos volátiles (Rodríguez y Leihner, 2006). Estas variables han sido usadas en la detección de plantas tolerantes a la sequía en cultivos como el arroz (Jacobs *et al.*, 2011), papa (Ahmad *et al.*, 2010) fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) (Husaini y Abdin, 2008) y plátanos y bananos (Bidabadi *et al.*, 2012, Mahmood *et al.*, 2012).

3.4.3. Indicadores bioquímicos

3.4.3.1. Prolina

La prolina es sin dudas el indicador bioquímico más ampliamente utilizado en la detección de plantas tolerantes a estrés abiótico en general, cuando se realiza un análisis de la literatura científica referente al tema. Esto viene dado porque ante situaciones desfavorables de estrés ocurre un incremento significativo de este aminoácido en las células vegetales. La prolina es un compuesto orgánico altamente soluble que no posee carga a pH fisiológico y que se almacena en altas concentraciones dentro de las células sin ser tóxico (Moreno *et al.*, 2010). Tadeo y Gómez-Cárdena (2008) consideran este aminoácido como un osmolito compatible con el funcionamiento celular, y refieren que la función principal de este tipo de compuestos cuando las plantas están en presencia de un déficit hídrico es facilitar la retención de agua en el citoplasma. Además, a la prolina se le atribuyen otras funciones importantes que contribuyen a minimizar los daños provocados por el estrés hídrico, por ejemplo, mantener el potencial redox celular (Hare *et al.*, 1998), capturar ROS, y constituir una fuente de carbono y nitrógeno cuando las condiciones hídricas regresan a la normalidad (Paleg *et al.*, 2011). Algunos de los autores que han empleado la determinación de este compuesto para determinar la tolerancia al estrés hídrico específicamente en plátanos y bananos son Mahmood *et al.* (2012), Sreedharan *et al.* (2013) y Xu *et al.* (2014),

3.4.3.2. Clorofilas

Las clorofilas son una familia de pigmentos de estructura química común: un anillo de porfirina compuesto por un tetrapirrol con sustituyentes laterales y un átomo de Mg^{2+} central, además de una larga cadena llamada fitol. Existen varios tipos de clorofilas: a, b, c y d, con diversas longitudes de onda que les confieren propiedades de absorción según sus estructuras moleculares (Demmig-Adams y Demmig-Adams, 1996). Los principales tipos de clorofilas son la a y la b; la primera constituye el 75% de las clorofilas en plantas verdes y tienen como función

capturar energía luminosa en el espectro rojo y violeta. Por su parte, la clorofila de tipo b es un pigmento que tiene la propiedad de transferir la energía recibida a las clorofilas de tipo a, las cuales finalmente convierten la energía luminosa en energía química (Arnon *et al.*, 1949).

La clorofila puede detectarse fácilmente gracias a su comportamiento frente a la luz, por lo que medir ópticamente su concentración en una muestra de tejido vegetal permite indirectamente estimar la actividad fotosintética. De esta manera la medición de clorofila constituye un importante instrumento de detección de daños fisiológicos ante situaciones de estrés celular.

Entre las afectaciones que causa el déficit hídrico en las plantas está la pérdida de la capacidad fotosintética, que ocurre por daños a las membranas de los cloroplastos y como consecuencia se afectan las estructuras de las moléculas de clorofilas.

La disminución en la concentración de clorofilas en condiciones de estrés hídrico se relaciona también con un aumento de la actividad de la enzima clorofilasa, y como consecuencia se afectan los procesos de biosíntesis de estos pigmentos (Argentel *et al.*, 2006).

Considerando lo anterior, la determinación de clorofilas de manera general es también uno de los indicadores bioquímicos más ampliamente utilizados al igual que la prolina en la selección de plantas tolerantes al déficit hídrico. Las clorofilas han sido determinadas en este sentido en plantas como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Huang *et al.*, 2012), papa (Ahmad *et al.*, 2010) y además en plátanos y bananos (Rustagi *et al.*, 2014; Surendar *et al.*, 2013).

3.4.3.3. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Las células de las plantas son capaces de producir ROS especialmente el H_2O_2 de manera constitutiva en cantidades significativas. Esta producción está asociada fundamentalmente a compartimentos extracelulares (matriz extracelular) y es regulada por factores del desarrollo como hormonas, luz y daños mecánicos en la superficie de las plantas (Wojtaszek, 1997).

En respuesta al estrés osmótico inducido por sequía o altas concentraciones de sales se ha observado la acumulación de H_2O_2 , producido a partir de la dismutación del radical superóxido

por la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) (Asada *et al.*, 1974). El H₂O₂ en los cloroplastos es eliminado por acción de las enzimas Peroxidasas que utilizan los fotorreductores producidos en los tilacoides como donantes de electrones (Nakano y Asada, 1981). De esta manera, es poco probable que ocurra la difusión de esta molécula desde los cloroplastos hasta los peroxisomas; no obstante, ante una salida de un orgánulo a otro los niveles de H₂O₂ son reducidos por la actividad de la enzima Catalasa (CAT).

El H₂O₂ está relacionado con la modulación de la expresión de varios genes, incluidos los que codifican para enzimas antioxidantes (Neill *et al.*, 2002). Entre las ROS, esta parece ser la que desempeña el papel más importante en la señalización de los cambios estresantes, debido a su elevada estabilidad y largo tiempo de vida media en comparación con las demás. Para que el H₂O₂ funcione como molécula específicamente señalizadora, debe existir un mecanismo que reconozca el incremento en los niveles de esta especie. En este sentido el H₂O₂ puede interactuar con residuos de cisteína dentro de las proteínas. La modulación redox de proteínas podría potencialmente alterar la conformación proteica y afectar la actividad de las mismas, y por tanto dar inicio a subsecuentes respuestas celulares (Hung, *et al.*, 2005).

Ante un estrés por sequía el H₂O₂ puede llegar a acumularse en las membranas liposomales, pudiendo destruir este orgánulo y provocar la salida hacia el citosol de enzimas hidrolíticas que intensifican los procesos de hidrólisis y autólisis de los tejidos. De esta manera, un exceso de H₂O₂ en las células vegetales por encima de los niveles basales, provoca la acumulación de derivados tales como aldehídos lipídicos, cetonas y epóxidos, los cuales unidos a toxinas de naturaleza no lipídica como las especies altamente reactivas de quinonas, causan la intoxicación general en las células (Green, 1966).

El aumento de H₂O₂ en las células de las plantas sometidas a estrés hídrico, ya sea como una consecuencia del daño a las biomoléculas, o por el efecto que tiene el mismo en la señalización del estrés, es tomado en consideración para que esta ROS constituya también uno de los indicadores que más se utiliza para determinar la tolerancia al estrés hídrico en las plantas. En

este sentido también se ha realizado la determinación de H₂O₂ en cultivares de plátanos y bananos sometidos a estrés hídrico (Bidabadi *et al.*, 2011; Bidabadi *et al.*, 2012; Mahmood *et al.*, 2012).

3.4.3.4. Malondialdehído (MDA)

El MDA es uno de tres dialdehídos de carbono altamente reactivos producido como un subproducto de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Janero *et al.*, 1990), fenómeno conocido como peroxidación lipídica, que es un mecanismo bien establecido de la lesión celular tanto en las plantas como en los animales, y es un indicador de estrés oxidativo muy utilizado.

El MDA puede estar combinado con varios grupos funcionales en moléculas como proteínas, lipoproteínas, ARN y ADN (Sevilla *et al.*, 1997).

La forma más precisa de medir la peroxidación lipídica es cuantificar directamente los productos de hidroperóxido primario, sin embargo, estos son extremadamente difíciles de medir por su labilidad y además requieren procedimientos largos (Janero, 1990). En consecuencia, aunque el MDA es un producto final secundario del proceso mencionado, su determinación se ha convertido en la forma más rápida de estimar el daño a las membranas celulares como consecuencia del estrés oxidativo. El método es sencillo, se basa en la reacción con el ácido tiobarbitúrico a temperaturas elevadas (95-100°C) y la estimación se realiza espectrofotométricamente. Este indicador ha sido utilizado como criterio de tolerancia al estrés hídrico específicamente en plátanos y bananos por varios autores, algunos ejemplos son: Bidabadi *et al.* (2012), Mahmood *et al.* (2012), Shekhawat *et al.* (2013), Sreedharan *et al.* (2013) y Rustagi *et al.* (2014).

3.4.3.5. Enzimas relacionadas con el estrés oxidativo

Otro de los indicadores bioquímicos comúnmente empleados para la detección de plantas tolerantes al estrés hídrico es la actividad de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo.

Moreno (2009) plantea que en condiciones de estrés hídrico se sobreexpresan en las células las enzimas antioxidantes que junto con compuestos no proteicos, detoxifican a las plantas de los radicales libres. Esta cuestión así como el papel de estas enzimas ya ha sido tratada en acápites anteriores, algunas de ellas son: la SOD, la CAT, la Ascorbato Peroxidasa (APX), la Peroxidasa (POD), la Glutación Reductasa (GR) y la Monodehidroascorbato Reductasa (MDAR). Este tipo de indicadores ha sido usado también por varios autores, Chai *et al.* (2005) determinaron en plantas *in vitro* de banano, cultivares 'Berangan' y 'Mas' sometidas a estrés hídrico con PEG la actividad de las CAT, APX, SOD y GR y notaron un incremento de sus actividades como consecuencia del estrés. Por otra parte Baloglu *et al.* (2012) determinaron la actividad de las CAT, APX, GR en dos cultivares de girasol (*Helianthus annuus* L.) sometidas también a estrés por sequía y observaron resultados similares a aquellos de los autores citados anteriormente. Ahmad *et al.* (2010) obtuvieron plantas transgénicas de papa que sobreexpresaban genes de las enzimas SOD y APX y comprobaron cómo en condiciones de estrés la actividad de estas enzimas aumentaba con respecto a los controles no transformados, a diferencia de la actividad de las CAT que no mostró un aumento tan elevado como el de las otras dos.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos Generales

Material vegetal

Se emplearon plantas transgénicas *in vitro* del cultivar de banano Grande naine' (*Musa* AAA) altamente susceptible al déficit hídrico. Además, se emplearon plantas *in vitro* no transformadas de los cultivares de plátano 'Pelipita' y 'Manzano' con genotipos ABB y AAB respectivamente como controles tolerantes al déficit hídrico según Ravi *et al.* (2013), característica que se les atribuye por presentar en su genoma la contribución de la especie *M. balbisiana*.

Las plantas *in vitro* de cada cultivar se encontraban en fase de multiplicación entre el tercer y el quinto subcultivo, propagadas vía organogénesis según el protocolo propuesto por Orellana (1998). Se seleccionaron plantas con tres o más hojas completamente expandidas (Figura 1A) las cuales fueron cortadas por su parte superior aproximadamente a 1,0 cm de longitud medido desde la base. También se eliminaron del pseudotallo las capas de hojas más externas hasta obtener un explante inicial de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y 1,0 cm de altura; luego fueron sembrados seis explantes por cada frasco de cultivo. (Figura 1B).

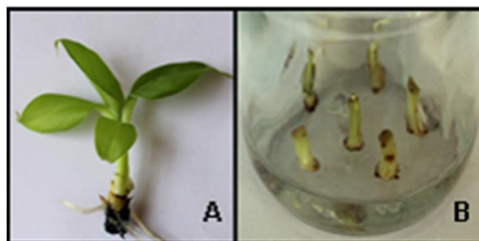


Figura 1. Planta *in vitro* de *Musa* spp. en medio de cultivo con PEG-6000 para la evaluación de la tolerancia a estrés hídrico. (A) Planta *in vitro* seleccionada para el experimento. (B) Aspecto inicial de los brotes *in vitro* en el medio de cultivo selectivo.

Procedencia de las líneas transgénicas

Se evaluaron dos líneas transgénicas (L-4 y L-57) transformadas con el gen *ap24* de *N. tabacum*, y que codifica para una proteína de tipo osmotina (AP24) perteneciente a la Clase 5 del grupo de las proteínas relacionadas con la patogenicidad. Las plantas fueron obtenidas

mediante la transformación de suspensiones celulares embriogénicas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 con el vector pAthsp-AP24. Este vector contiene entre dos sitios *loxP* orientados directamente, el casete de expresión del gen marcador de selección *pNos-hpt-tNos* y el gen de la recombinasa (*cre*) guiado por el promotor inducible a golpe térmico pHSP18.2 de *A. thaliana*. Fuera de los sitios *loxP* se ubicó el casete de expresión del gen que codifica para la osmotina AP24 (Chong-Pérez, 2012). La presencia, patrón de integración y expresión de transcriptos de este gen fueron corroborados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), hibridación por Southern blot y RT-PCR, respectivamente (Chong-Pérez, 2012).

Medios de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo semisólido de multiplicación, compuesto por: sales MS (4,3 g l⁻¹) (Murashige y Skoog, 1962) (Duchefa), tiamina 1,0 mg l⁻¹, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 4,0 mg l⁻¹, ácido indolacético (AIA) 5,0 mg l⁻¹, mio-inositol 100 mg l⁻¹, ácido cítrico 50 mg l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹, Gelrite (Duchefa) 2,8 g l⁻¹ y como agente inductor del estrés hídrico PEG-6000 a una concentración de 30 g l⁻¹, seleccionada a partir de resultados de experimentos preliminares. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 con NaOH 0,1 M y HCl 0,1 M, y se dosificó en frascos de vidrio con capacidad total de 250 ml (30 ml por cada frasco). Posteriormente los frascos fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1,2 kg cm⁻² de presión durante 20 min según la información técnica de la firma Sigma Co. (Zhu, 2002).

Condiciones de trabajo

El instrumental para el manejo de las plantas (pinzas y bisturís) se esterilizó en un esterilizador de bolas de vidrio a 280°C. Los platos metálicos sobre los cuales se efectuó el proceso de corte de las plantas se esterilizaron a 180°C en estufa durante 2 h. La siembra de las plantas se realizó bajo condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar vertical.

Condiciones de cultivo

Los frascos de cultivo con los brotes fueron colocados en una cámara de crecimiento de luz solar con una intensidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos entre 70-85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante 30 días, tiempo al cual fueron evaluados indicadores de estrés hídrico de tipo morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

Diseño experimental y procesamiento estadístico

Se tuvieron en cuenta dos tratamientos: plantas *in vitro* sometidas a estrés y plantas no sometidas a estrés hídrico con PEG-6000. Para la determinación de las variables morfológicas se evaluaron 40 plantas, para las fisiológicas se evaluaron diez plantas excepto para la MF, la cual se determinó a 40 plantas de cada cultivar para cada tratamiento respectivamente.

Para determinar las variables bioquímicas se emplearon ocho repeticiones por cada tratamiento para cada cultivar respectivamente. Cada repetición estuvo conformada por seis plantas *in vitro* que se pulverizaron juntas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C , para posteriormente tomar la cantidad necesaria para hacer las determinaciones; estas se realizaron por espectrofotometría, con el uso de un espectrofotómetro GENESYS 6 (Thermo Electronic Corporation; Visionlite; Versión 2,1).

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS ver. 18,0 para Windows. Para el procesamiento de los resultados se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas según se describe en cada experimento, con previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas por las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Para cada análisis se fijó un intervalo de confianza de un 95% ($p < 0,05$). Las comparaciones para cada variable se realizaron entre cultivares para un mismo tratamiento, y en un mismo cultivar para ambos tratamientos.

3.1. Determinación de indicadores de estrés hídrico morfológicos, fisiológicos y bioquímicos

Con el objetivo de determinar la tolerancia *in vitro* de las plantas al déficit hídrico inducido con el PEG-6000 se evaluaron variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas indicadoras de estrés.

3.1.1. Indicadores morfológicos (altura de la planta y número de brotes por explante)

Se determinó el número de brotes por explante y la altura de la planta (cm) medida con una regla graduada desde la base de cada planta hasta el punto de inserción en el pseudotallo de la hoja más joven completamente expandida (Figura 2). Para el procesamiento estadístico de los resultados se aplicaron en cada caso las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para $p < 0,05$.



Figura 2. Medición de la altura de plantas *in vitro* de banano a los 30 días de cultivo en medio semisólido de multiplicación.

3.1.2. Indicadores fisiológicos

3.1.2.1. Masa fresca (MF) y masa seca (MS)

La MS (g) se obtuvo tras pesar las plantas inmediatamente después de extraerlas de los frascos de cultivo. Para determinar la MS (g), las plantas se secaron en la estufa a 60°C y se pesaron varias veces en el tiempo hasta mantener peso constante.

3.1.2.2. Contenido Relativo de Agua (CRA)

El CRA fue se determinó según Shekhawat *et al.* (2011). Para ello fue necesario obtener primeramente la MF (g), luego la masa de la planta en estado de turgencia (MT) (g) y por último la MS (g). Las variables MF y MS se determinaron de la manera descrita anteriormente mientras

que para obtener la MT, tras obtener la MF, las plantas se hicieron flotar en agua desionizada a 4°C durante toda la noche y luego fueron pesadas después de retirar el exceso de agua sobre papel de filtro. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$CAR = \frac{MF - MS}{MT - MS} * 100$$

Para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos para cada variable fisiológica se aplicaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney respectivamente para $p < 0,05$.

3.1.3. Indicadores bioquímicos

3.1.3.1. Contenido de prolina

El contenido de prolina se determinó por el método de Bates *et al.* (1973) con modificaciones: a 100 mg de tejido vegetal previamente macerado en nitrógeno líquido se le adicionaron 2 ml de ácido sulfosalicílico al 3% (m/v) y se calentó a 100°C durante 15 min. Posteriormente el homogenizado se enfrió en baño de agua corriente y se centrifugó a 10 000 g por 2 min. Se extrajeron 2 ml del sobrenadante y se adicionaron 2 ml de ninhidrina en medio ácido (0,1 561 g de ninhidrina + 3,75 ml de ácido acético glacial + 2,5 ml de ácido fosfórico 3 M; (Moreno *et al.*, 2010) y ácido acético glacial respectivamente. La mezcla anterior fue calentada a 100°C durante 45 min y luego se enfrió en hielo para terminar la reacción. A continuación, se le adicionaron 4 ml de tolueno, se agitó vigorosamente durante 10 s en vórtex y se dejó reposar durante 3 min aproximadamente. Se extrajo la parte orgánica (fase superior) y se leyó la absorbancia de esta a 520 nm, se utilizó como blanco el tolueno. El contenido de prolina se determinó por una curva de calibración previamente realizada con concentraciones conocidas de este aminoácido disuelto en tolueno. Los datos se procesaron por las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para $p < 0,05$.

3.1.3.2. Contenido de clorofilas totales (a+b)

Para determinar el contenido de clorofila total se empleó el protocolo descrito por Mahmood *et al.* (2012) con las siguientes modificaciones: a 100 mg de tejido vegetal previamente macerado en nitrógeno líquido, se le añadieron 1,7 ml de acetona al 80% (v/v) en solución tampón de fosfato de sodio 2,5 mM (pH 7.8). Posteriormente la mezcla se agitó en vórtex durante 15 min y se centrifugó a 4°C durante 15 min a 1 157 g. A continuación se midió la absorbancia del sobrenadante a 645 y 663 nm utilizando como blanco acetona al 80% en solución tampón de fosfato de sodio 2,5 mM (pH 7.8). Para el cálculo se empleó la siguiente ecuación propuesta por Porra *et al.* (1989):

$$[\text{Chl a+b}] = 17.76 E_{646.6} + 7.34 E_{663.6}$$

El análisis estadístico de los datos obtenidos se efectuó por las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para $p < 0,05$.

3.1.3.3. Contenido de malondialdehído (MDA)

El contenido de MDA se determinó según Wang *et al.* (2009) como se describe a continuación: a 100 mg de tejido vegetal previamente macerado en nitrógeno líquido se le añadieron 5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,6% (v/v) en ácido tricloroacético (TCA) al 10% (m/v) y se dejó reposar durante 5 min. Luego se calentó la mezcla a 100°C por 15 min, se enfrió en hielo por 5 min y se centrifugó inmediatamente a 1 500 g durante 10 min a 4°C. La absorbancia del sobrenadante fue medida a 450, 532 y 600 nm utilizando como blanco TCA al 10%. Para calcular la concentración de MDA se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Equivalentes de MDA (nmol g MF}^{-1}\text{)} = 6.45 (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56 (\text{OD}_{450}) \times 1000$$

Para el análisis estadístico de los datos se realizó la prueba paramétrica de Tukey para $p < 0,05$.

3.1.3.4. Contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El contenido de H_2O_2 se determinó según lo descrito por Mahmood *et al.* (2012). A 200 mg de tejido vegetal previamente macerado en nitrógeno líquido se le adicionó 1 ml de TCA al 0,1% (m/v) y luego se centrifugó a 12 000 g por 15 min. Se tomaron 0.5 ml del sobrenadante y se le adicionaron 0,5 ml de solución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) y 1 ml de yoduro de potasio 1 M disuelto en agua bidestilada. Inmediatamente se leyó la absorbancia a 390 nm utilizando como blanco TCA al 0,1% (m/v). El contenido de H_2O_2 se determinó por una curva de calibración previamente realizada con concentraciones conocidas de este compuesto. Para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó la prueba paramétrica de Tukey para $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

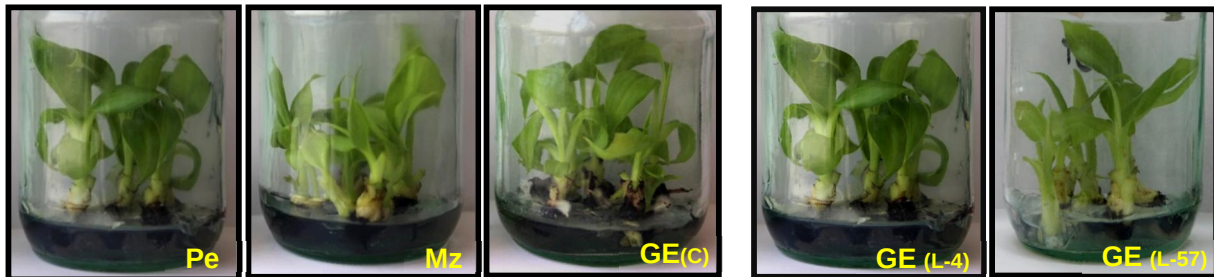
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de indicadores de estrés hídrico morfológicos, fisiológicos y bioquímicos

4.1.1. Indicadores morfológicos (Altura de la planta y número de brotes por explante)

Se observó una disminución en la altura de las plantas sometidas a estrés hídrico con PEG-6000 en todos los casos cuando se comparan con las plantas no sometidas a estrés. Estas diferencias comenzaron a notarse a partir de los 15 días de cultivo, y fueron significativas al finalizar el experimento a los 30 días (Figuras 3 y 4).

PLANTAS NO SOMETIDAS A ESTRÉS



PLANTAS SOMETIDAS A ESTRÉS

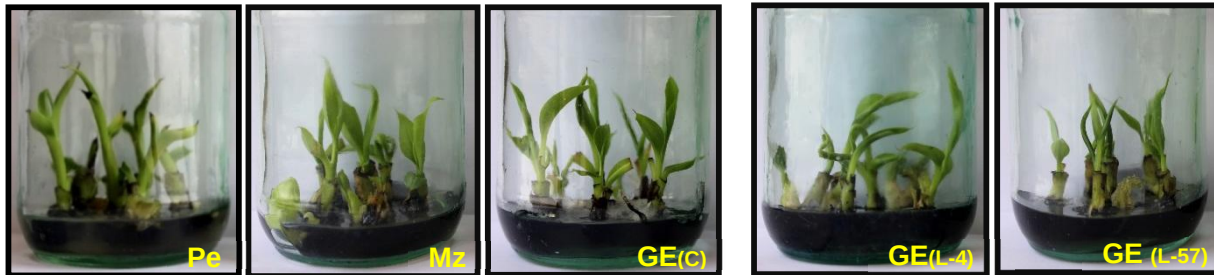


Figura 3. Plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. no sometidas y sometidas a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano 'Pelipita' (*Musa* ABB) y 'Manzano' (*Musa* AAB) respectivamente, GE (C): cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa* AAA) (plantas controles no transformadas), GE (L-4) y GE (L-57): Líneas transgénicas del cultivar 'Grande naine' transformadas con el gen de osmotina *ap24*.

Cuando se comparan solamente las plantas sometidas a estrés se observó una mayor disminución de la altura en las plantas de las líneas transgénicas del cultivar 'Grande naine' transformadas con el gen *ap24* (L-4 y L-57), la cual fue significativa con la que ocurrió en las plantas del mismo tratamiento de los cultivares 'Pelipita', 'Manzano' y 'Grande naine' no transformadas (Figura 4).

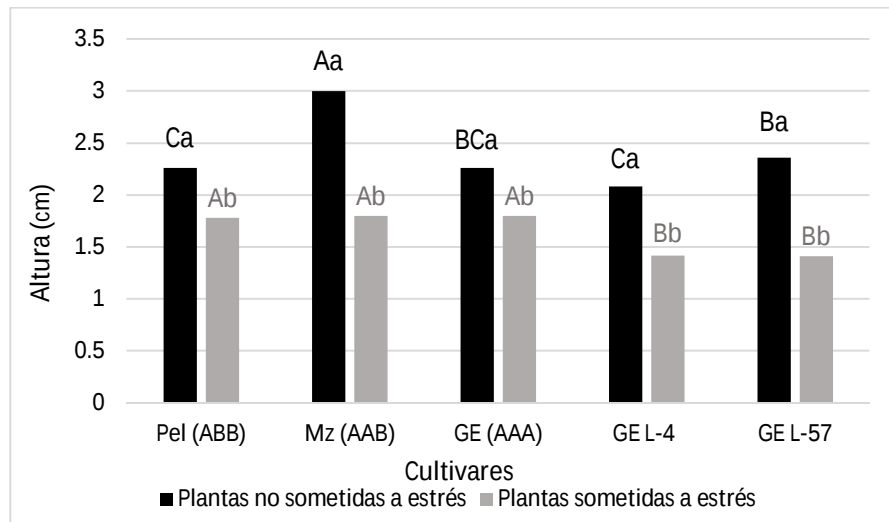


Figura 4. Altura de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano 'Pelipita' (*Musa* ABB) y 'Manzano' (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar 'Grande naine' transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

El número de brotes por explante también se vio afectado por el estrés (Figuras 4 y 5). Sin embargo la disminución de este indicador no fue estadísticamente significativa para el cultivar 'Pelipita' ni para las plantas controles no transformadas del cultivar 'Grande Naine', cuando se comparan plantas de ambos tratamientos en cada uno de estos cultivares (Figura 5). En cambio, en las líneas transgénicas y en el cultivar 'Manzano' si se observaron diferencias estadísticamente significativas al realizar la misma comparación (Figura 5).

Cuando se comparan solamente las plantas sometidas a estrés, no se observaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la reducción del número de brotes entre las plantas del cultivar 'Grande Naine' transformadas y no transformadas, y sí, entre todas estas y las de los cultivares 'Manzano' y 'Pelipita', respectivamente. A su vez se observaron diferencias estadísticas significativas entre estos dos últimos cultivares correspondiendo la mayor reducción al 'Manzano' y la menor al 'Pelipita'.

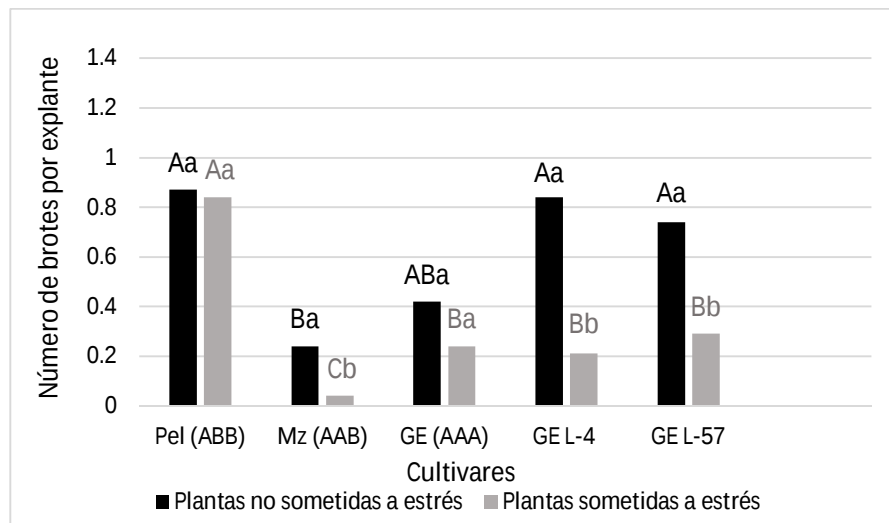


Figura 5. Número de brotes por explante de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano 'Pelipita' (*Musa* ABB) y 'Manzano' (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar 'Grande naine' transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

Los resultados del presente estudio apoyan lo informado por Jaleel *et al.* (2009) quienes plantean que el crecimiento de las plantas de manera general es uno de los procesos que se ven afectados por el estrés abiótico. Por otro lado, Surendar *et al.* (2013) refieren que la altura de la planta es un importante indicador morfológico relacionado con el crecimiento y desarrollo de los cultivos, procesos que envuelven a su vez el crecimiento y desarrollo celular; estos últimos consisten en la división, alargamiento y diferenciación de las células, y son muy sensibles al

déficit hídrico por su dependencia con el grado de turgencia de las mismas (Wareing y Phillips, 1970).

Una disminución en diferentes caracteres morfológicos de plantas de plátanos y bananos sometidas a estrés hídrico, también ha sido señalada por otros autores, por ejemplo, Bidabadi *et al.* (2012) y Mahmood *et al.* (2012) observaron una reducción en la altura y la brotación de plantas *in vitro* de banano cv. 'Berangan', sometidas a estrés hídrico con PEG-6000 a una concentración de 30 g l⁻¹.

En cultivares de plátano con genotipo balbisiana (B) considerado como tolerante (Ravi *et al.*, 2013), también se han realizado estudios, en los cuales se ha observado cómo se afectan diferentes caracteres morfológicos en aquellas plantas sometidas al estrés. Mohd *et al.* (2004) detectaron una disminución en la altura de la planta y en la longitud y el número de hojas en el cultivar 'Pisang mas' (*Musa* ABB) sometido a estrés en condiciones de campo. También Surendar *et al.* (2013) experimentaron una reducción de la altura de la planta en los cultivares 'Ney Povan' (*Musa* AB), 'Poovan' (*Musa* AAB), 'Karpuravalli' (*Musa* ABB) y 'Saba' (*Musa* ABB), sometidos a estrés en campo, en este caso la disminución fue menor comparada con la que ocurrió en plantas de banano con genotipo acuminata (A) bajo las mismas condiciones. Estos últimos resultados, aunque no corresponden a condiciones *in vitro* se asemejan a los obtenidos en el presente estudio.

En otros cultivos también ha sido observada una reducción en indicadores morfológicos evaluados en plantas sometidas a estrés. Parkhi *et al.* (2009) transformaron plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) con un gen que codifica para una osmotina y observaron una disminución en la longitud del tallo tanto en las plantas transformadas como en las no transformadas, sin embargo la reducción en las transgénicas fue menor que en sus controles no transformados. Estos resultados no coinciden con los del presente estudio, en el cual la disminución en la altura ocurrió en todos los casos sin diferencias significativas entre los cultivares.

La afectación que experimentaron las plantas de las líneas transgénicas sometidas a estrés en los caracteres morfológicos evaluados, no indica necesariamente que estas no sean capaces de tolerar las condiciones impuestas; si se tiene en cuenta que también estos caracteres se afectaron tanto en las plantas no transformadas del mismo cultivar 'Grande Naine', como en las plantas de los demás cultivares considerados como tolerantes.

Se plantea por Valladares *et al.* (2004), que como consecuencia del estrés hídrico las plantas pueden emitir varias respuestas, entre ellas evitarlo o tolerarlo. Estas respuestas conllevan una limitación del crecimiento, la evitación por una parte constituye una estrategia para el ahorro de agua, y por otra parte la tolerancia es una estrategia, bien para evitar la deshidratación a través del ajuste osmótico, o bien para tolerarla a través de los sistemas antioxidantes, reparadores, o mediante la síntesis de solutos compatibles.

Teniendo en cuenta la explicación anterior, si aumentan en la planta los solutos compatibles, con una disminución en la altura y el número de brotes, se estaría poniendo de manifiesto la estrategia de tolerancia sugerida por Valladares *et al.* (2004).

Por otro lado, Patel *et al.* (2002) refieren que el estrés provoca una disminución en la síntesis de proteínas. Al disminuir este proceso celular ocurre también una disminución del crecimiento, los aminoácidos en estas condiciones son convertidos a glutamato, el cual luego se convierte en prolina, y la prolina está considerada como un soluto compatible al que se le atribuyen varias funciones celulares cuyo objetivo fundamental es proteger a las plantas contra el estrés osmótico (Rai *et al.*, 2010).

La afectación en los parámetros morfológicos ha sido usada por algunos de los autores que se citan como criterio de selección de plantas *in vitro* tolerantes al estrés hídrico, sin embargo los resultados presentados en este acápite sugieren que por sí solos no deben ser empleados; a menos que se analice una relación de estos indicadores con otras variables que permita concluir que la disminución que se observó constituye una estrategia para tolerar el estrés.

4.1.2. Indicadores fisiológicos

4.1.2.1. Masa fresca (MF) y masa seca (MS)

La MF disminuyó significativamente en todos los casos excepto para el cultivar 'Pelipita' en las plantas tratadas con PEG-6000 en comparación con las no tratadas. La mayor disminución se observó en el cultivar 'Manzano' y en ambas líneas transgénicas del cultivar 'Grande naine' (Figura 6).

Al comparar solamente plantas sometidas a estrés, en la figura 6 también se puede observar como los mayores valores de MF se obtuvieron en el cultivar 'Pelipita' y en las plantas controles no transformadas del 'Grande naine' sin diferencias significativas entre ellas. Le siguieron en orden descendente las plantas de las líneas transformadas de 'Grande naine', sin diferencias significativas entre ellas ni con las no transformadas del mismo cultivar; y sí con las del cultivar 'Pelipita' respectivamente. Las plantas que menor MF tuvieron fueron las sometidas a estrés del cultivar 'Manzano' con diferencias significativas con el resto.

La MS disminuyó significativamente solo para las plantas controles no transformadas del cultivar 'Grande naine', y para las de la línea transgénica L-57 de este mismo cultivar (Figura 7).

Al realizar la comparación entre plantas tratadas con PEG-6000 solamente, en la figura 7 también se puede observar que las que mayor MS acumularon fueron las del cultivar 'Manzano', la línea L-4 del cultivar 'Grande naine' sin diferencias significativas entre ellas. Esta última no mostró diferencias significativas con las de los cultivares 'Pelipita' y 'Grande naine' (plantas controles no transformadas y plantas de la línea L-57).

La MF y la MS han sido empleadas como variables fisiológicas indicadoras de estrés por varios autores (Yin *et al.*, 2005; Parkhi *et al.*, 2009; Mahmood *et al.*, 2012). La primera constituye la cantidad de biomasa que tiene una planta o una parte de esta, conjuntamente con el agua que

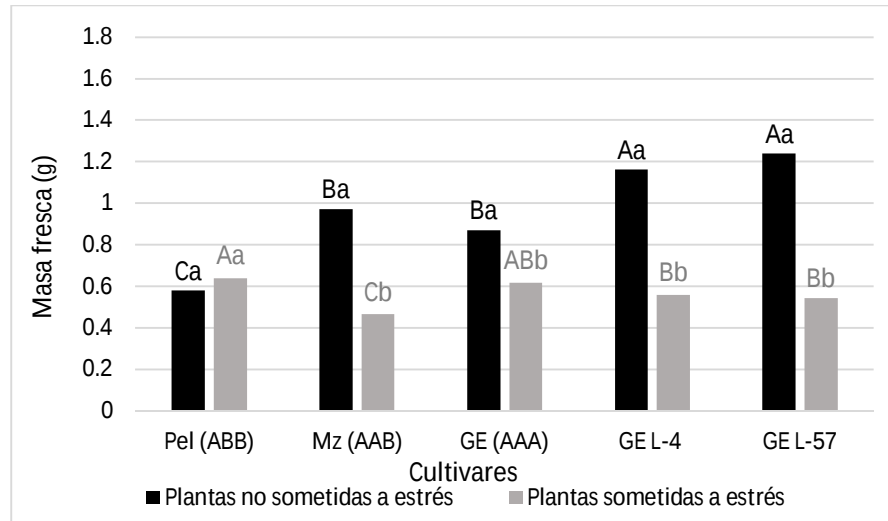


Figura 6. Masa fresca de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (*Musa* ABB) y ‘Manzano’ (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano ‘Grande naine’ (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar ‘Grande naine’ transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

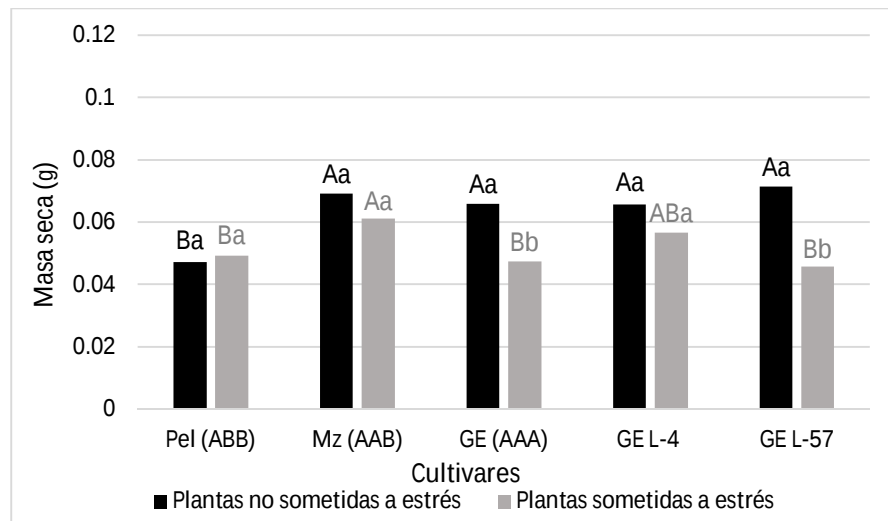


Figura 7. Masa seca de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (*Musa* ABB) y ‘Manzano’ (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano ‘Grande naine’ (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar ‘Grande naine’ transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

dicha cantidad de biomasa es capaz de retener bajo unas condiciones dadas, independientemente de que sus células estén o no en un estado de máxima hidratación o turgencia. La MS por su parte es solamente la cantidad de biomasa de un tejido, órgano o planta completa independiente de la cantidad agua que contengan las células que lo(a) componen. Según Rodríguez y Leihner (2006), esta variable se incrementa a medida que las plantas crecen; sin embargo una vez que la planta muere la MS que fue capaz de acumular es constante.

Ambas variables pueden ser indicadores fisiológicos de un déficit hídrico porque dependen de procesos fisiológicos y celulares que se ven afectados por el estrés osmótico en las plantas. La MS al constituir solamente la biomasa, depende, semejante a las variables morfológicas, de la síntesis de proteínas y de otros componentes estructurales que constituyen en su conjunto la célula, y además de la división y del alargamiento de las mismas, procesos que como se explicó en el subacápite referido a la altura y al número de brotes son dependientes del agua y del grado de turgencia celular. También la MF depende de los procesos de los cuales la masa seca es dependiente, pero teniendo en cuenta que en ella está incorporada la cantidad de agua que presenta una planta, un tejido o un órgano en particular, pues también está influenciada por otros procesos fisiológicos como la absorción de agua, la retención de la misma los tejidos, y la transpiración.

En el presente estudio ambas variables se vieron afectadas por el estrés indistintamente para algunos cultivares excepto para el 'Pelipita', en el cual ninguna de las dos se modificó de manera significativa cuando se comparan plantas con estrés y sin estrés (Figuras 6 y 7). Este resultado para este cultivar en particular sugiere que las plantas tratadas con PEG-6000 fueron capaces de tolerar el estrés a la concentración utilizada de este agente osmoestrante, demostrando además que los procesos fisiológicos o celulares de los cuales dependen estos indicadores no se afectaron.

En cambio, la disminución significativa de la MF en las plantas sometidas a estrés del resto de los cultivares, comparadas con sus respectivos controles no sometidos a estrés (Figura 6), indica que en estos casos el PEG-6000 sí afectó tanto la producción de biomasa como la ganancia y retención de agua por parte de los tejidos de estas plantas.

A diferencia de la MF, la MS se afectó solamente en plantas del cultivar 'Grande naine' sometidas a estrés (controles no transformados y línea transgénica L-57) (Figura 7). Este resultado indica que en estos casos con la condición impuesta, la deficiencia de agua en los tejidos afectó los procesos celulares que se mencionan responsables de la formación de nuevas células.

Las plantas de las líneas transgénicas L-57 y L-4 tratadas con PEG-6000 respondieron de manera diferente. En el primer caso si se comparan con las no tratadas disminuyeron de manera significativa las dos variables, mientras que en el segundo caso solo disminuyó significativamente la MF si se realiza la misma comparación (Figuras 6 y 7). Este resultado para la línea L-4 indica que la misma presentó una mayor capacidad que la línea L-57, e incluso que las plantas controles del mismo cultivar, para producir biomasa bajo las condiciones de estrés impuestas, lo cual pudiera representar una mayor tolerancia por parte de esta línea en este sentido.

Semejante a los resultados del presente estudio, una disminución de la MF y la MS también ha sido observada por otros autores como consecuencia de un estrés hídrico, ya sea en condiciones *in vitro* como en condiciones de campo. Yin *et al.* (2005) evaluaron la MS en plantas de *Populus kangdingensis* C. Wang Tung, sometidas a diferentes regímenes de déficit hídrico en condiciones de campo y observaron una disminución de esta variable en diferentes órganos de las plantas (raíces, tallos y hojas) a medida que el estrés fue más severo.

Baloglu *et al.* (2012) por su parte determinaron también la MS pero en este caso en plantas recién germinadas de girasol en condiciones *in vitro*. Estos autores evaluaron a través de la determinación de esta variable, el grado de tolerancia a la sequía de dos variedades de este

cultivo, para ello sometieron a las plantas a un estrés hídrico mediante irrigación con solución nutritiva de Hoagland con PEG-6000 al 10% y al 20% (p/v). En este se observó también una disminución de la MS en el tallo y las raíces de estas plantas sometidas a estrés, que fue considerablemente mayor en una variedad que en la otra. Con estos resultados se pudo detectar una mayor tolerancia a las condiciones impuestas en aquella variedad en la cual se observó la menor disminución en la MS.

Por otra parte, Parkhi *et al.* (2009) evaluaron la MF de plantas *in vitro* de algodón transformadas con un gen de osmotina de *N. tabacum* L., sometidas a estrés hídrico con PEG-6000 a una concentración de 150 g l⁻¹. Estos autores observaron una disminución en la variable evaluada tanto en las plantas transformadas como en las no transformadas, sin embargo la MF disminuyó más en las plantas no transformadas que en aquellas a las cuales se les incorporó el gen de la proteína.

Por último, Mahmood *et al.* (2012) evaluaron la MF en plantas *in vitro* de banano cv. 'Berangan' sometidas a estrés hídrico con PEG-6000 a la misma concentración empleada en el presente estudio (30 g l⁻¹). Estos autores también obtuvieron una disminución de la MF en las plantas sometidas a estrés comparadas con las crecidas en condiciones normales.

Todos los trabajos anteriores informan sobre la disminución de estas variables debido al estrés por falta de agua en las plantas, con lo cual se evidencia que son dependientes de este recurso. Sin embargo algunos de ellos las han podido emplear para la detección de variedades o cultivares más tolerantes al déficit hídrico (Parkhi *et al.*, 2009; Baloglu *et al.*, 2012). En el presente trabajo el resultado obtenido para la MF indica que no debe ser usada con este propósito a la concentración de PEG-6000 empleada. Sin embargo, teniendo en cuenta el resultado obtenido para la línea transgénica L-4 al evaluar la MS, esta última variable si se podría tener en cuenta para futuros trabajos de selección de cultivares tolerantes a la sequía.

4.1.2.2. Contenido relativo de agua

El CRA varió significativamente solo para las dos líneas transformadas del cultivar 'Grande naine', en las cuales se observó una disminución de este indicador en las plantas sometidas a estrés con respecto a las crecidas en condiciones normales (Figura 8).

Cuando se comparan solamente plantas tratadas con PEG-6000 en la misma figura se puede observar que los mayores valores del CRA corresponden a los cultivares 'Pelipita' y 'Manzano' sin diferencias estadísticas significativas entre ellos.

Al realizar la misma comparación solo entre plantas sometidas a estrés en el cultivar 'Grande naine', no se observaron diferencias significativas entre las transformadas y las no transformadas. Todas ellas mostraron menores valores de CRA que los cultivares anteriores, si se comparan estos valores con las plantas del cultivar 'Pelipita' se observan diferencias significativas, en cambio si se comparan con las del cultivar 'Manzano' no se observan diferencias significativas con las plantas transgénicas de la línea L-4 y sí con las de la línea L-57 y controles no transformadas respectivamente.

Sin embargo, si se compara el CRA solamente de las plantas que crecieron en condiciones normales, se puede observar también en la figura 8 como los mayores valores corresponden a las plantas transformadas con el gen de la osmotina AP24, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas y sí con el resto de las plantas del mismo tratamiento respectivamente.

El CRA, si se analiza su ecuación, es la razón que existe entre el agua que tiene una planta en las condiciones normales en las que creció (MF-MS, en el numerador) y la máxima cantidad de agua que pudiera llegar a tener en condiciones de saturación de sus tejidos (MT-MS, en el denominador) expresado en porciento. Esta variable es indicadora por tanto, del grado de hidratación del tejido vegetal

Este indicador ha sido ampliamente utilizado en las determinaciones de tolerancia de las plantas al déficit hídrico. Numerosos autores lo han empleado para diferenciar plantas no transformadas

de plantas transformadas con genes que codifican para proteínas que intervienen en el ajuste osmótico de las células en condiciones de escases de agua.

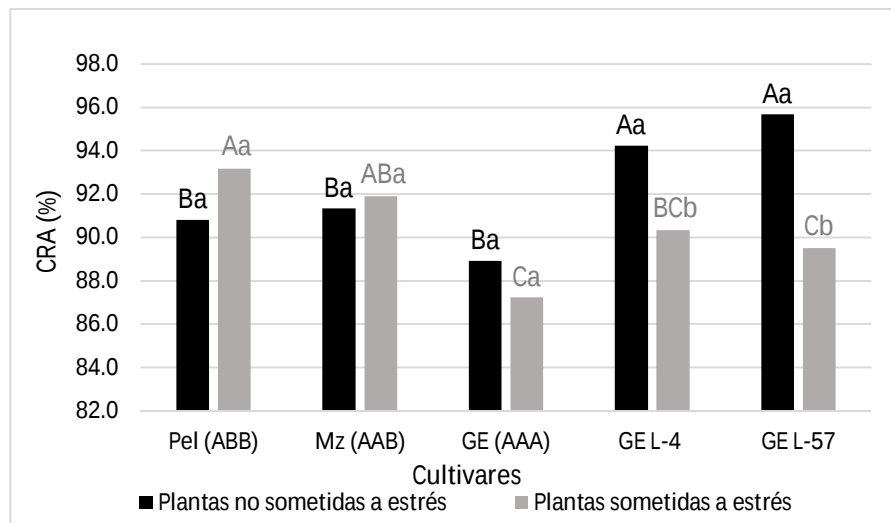


Figura 8. Contenido relativo de agua (CRA) de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (*Musa* ABB) y ‘Manzano’ (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano ‘Grande naine’ (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar ‘Grande naine’ transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

Por ejemplo, Parkhi *et al.* (2009) determinaron el CRA en hojas de plantas de algodón que expresaban un gen de osmotina y obtuvieron en ellas mayores valores de esta variable comparadas con las no transformadas. El mismo resultado fu obtenido por Annon *et al.* (2014) en hojas de plantas de zanahoria transformadas también con un gen de osmotina.

Por otro lado, Sreedharan *et al.* (2013) determinaron el CRA en raíces y en hojas de plantas aclimatizadas de plátano cv. ‘Rasthali’ transformadas con un gen de acuaporina, y en ambas partes de la planta el CRA fue mayor comparado con el de las plantas no transformadas. Shekhawat *et al.* (2011) determinaron este indicador en hojas de plantas *in vitro* y aclimatizadas respectivamente también en el cultivar de plátano ‘Rasthali’ transformado con un gen de

dehidrina. Para ambas condiciones el CRA fue mayor en las plantas transgénicas sometidas a estrés, comparadas con sus controles no transformados también en presencia del déficit de agua. En banano, Mahmood *et al.* (2012) determinaron el CRA en hojas de plantas *in vitro* del cultivar 'Berangan', sometidas a déficit hídrico con PEG-6000 y tratadas además con Metil Jasmonato (MeJA) para aliviar el estrés. En este caso el porcentaje del indicador fisiológico fue mayor también en las plantas sometidas a estrés y en presencia del regulador de crecimiento, que en aquellas plantas bajo estrés sin el tratamiento con MeJA.

En el presente estudio, el hecho de que en las plantas transformadas con el gen *ap24* y no sometidas a estrés se hayan observado los mayores valores de CRA, comparadas con las demás plantas en este mismo tratamiento (Figura 8), indica que bajo estas condiciones la osmotina desempeñó un papel positivo en el grado de hidratación de las plantas transgénicas. Sin embargo, con el déficit de agua este indicador fisiológico no mostró diferencias significativas entre las plantas de 'Grande naine' no transformadas y transformadas, contrario a lo que sucedió en los estudios que se mencionan anteriormente que evalúan el indicador en plantas transgénicas, comparadas con no transgénicas en condiciones estresantes. Estos resultados indican que, bajo las condiciones de estrés, el ajuste osmótico en las plantas con la osmotina no fue tan efectivo como el que se observó en las condiciones normales.

En los estudios que se citan, en los cuales las plantas transformadas sometidas a estrés si han acumulado mayor cantidad de agua, comparadas con las no transformadas tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*, el material vegetal utilizado para determinar el CRA ha sido partes de la planta (hoja y/o raíz). En el presente estudio se utilizan plantas *in vitro* completas, factor que pudo influir en el resultado presentado en este acápite. Munns (2010) define el CRA como "el contenido de agua de una cantidad dada de hoja, relativo a su estado totalmente hidratado o de completa turgencia", según este autor los cambios en el CRA son proporcionales a los cambios en el estado de turgor de la hoja.

Teniendo en cuenta la definición que hace Munns (2010) de este indicador, y además que los estudios que se mencionan se han realizado en su mayoría en hojas de plantas, pudiera sugerirse para futuros experimentos utilizar solamente esta parte de la planta en lugar de plantas completas para determinar el CRA. Pudiera tenerse en cuenta además, la evaluación de otras variables o procesos fisiológicos que también pudieran haber influido, en que para las líneas transgénicas no sometidas a estrés la osmotina AP24 si haya ejercido un papel positivo en la hidratación de la planta, y bajo condiciones de estrés no sucediera así. De esta manera, el CRA quizás sí se pudiera utilizar como un indicador que permita detectar la tolerancia al estrés hídrico en plantas transformadas, como es empleado por la mayoría de los autores en estudios similares.

4.1.3. Indicadores bioquímicos

4.1.3.1 Contenido de prolina

Se observó un aumento en el contenido de prolina en las plantas sometidas a estrés de todos los cultivares y de las líneas transgénicas, comparadas con las plantas no sometidas al estrés. Este aumento fue significativo para todos los casos excepto para el cultivar 'Pelipita'. (Figura 9) Al comparar el contenido de prolina solamente entre plantas tratadas con PEG-6000, en la figura 9 se puede apreciar también como los mayores valores corresponden a los cultivares 'Manzano' y 'Pelipita', sin diferencias significativas entre ellos, y ambos con diferencias significativas con las plantas del cultivar 'Grande naine' (transformadas y no transformadas). Por otra parte, entre las plantas transgénicas y controles de este último cultivar en presencia del PEG-6000 no se observaron diferencias significativas en el aumento del contenido del aminoácido.

La prolina es un compuesto osmoprotector para las células vegetales (Tadeo y Gómez-Cárdenas, 2008). Según estos autores los osmoprotectores son solutos compatibles con el funcionamiento celular en condiciones de estrés osmótico, que puede estar dado por factores como la sequía, salinidad y elevadas temperaturas. Cuando las plantas se encuentran expuestas a alguna de estas condiciones ocurre una reducción del potencial hídrico de los tejidos. Los

osmoprotectores se acumulan entonces para reajustar el potencial hídrico intracelular, ya que pueden actuar bien como osmolitos, facilitando la retención de agua por el citoplasma, o como verdaderos compuestos protectores que estabilizan la estructura de las membranas y de las macromoléculas.

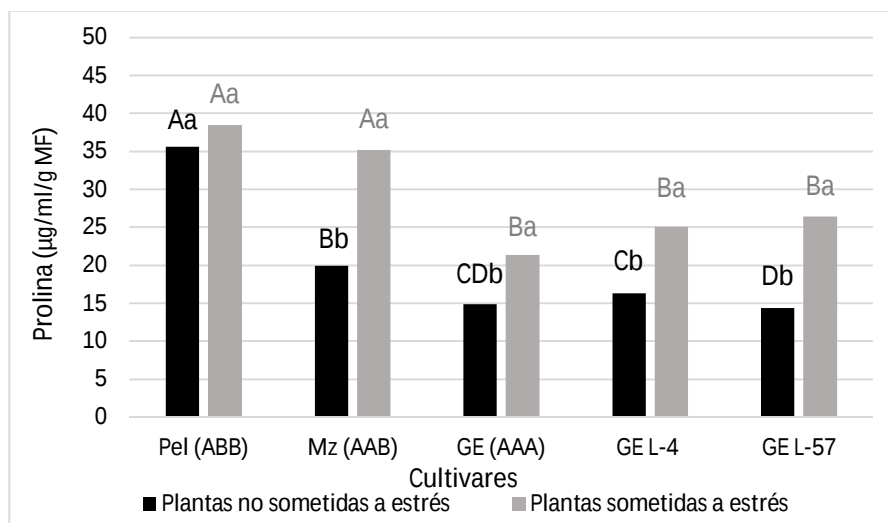


Figura 9. Contenido de prolina en plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (*Musa* ABB) y ‘Manzano’ (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano ‘Grande naine’ (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar ‘Grande naine’ transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

A la prolina, además de estas funciones, se le atribuyen otras que permiten la protección de las plantas en presencia de un déficit de agua, estas son: mantener el potencial redox celular (Hare *et al.*, 1998), capturar ROS, y constituir una fuente de carbono y nitrógeno cuando las condiciones hídricas regresan a la normalidad (Paleg *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el incremento del contenido de prolina en aquellas plantas sometidas al estrés hídrico puede interpretarse como una respuesta a favor de tolerar el estrés al que fueron sometidas. Esto lo pudiera corroborar el hecho de que el mayor aumento se

observó, comparando plantas sometidas y no sometidas a estrés, en el cultivar 'Manzano' considerado como tolerante.

Aunque el cultivar 'Pelipita' también está considerado como tolerante, contrario a lo que sucedió con el 'Manzano', fue el que menor incremento de prolina experimentó si se realiza la misma comparación. Esto pudo deberse a que el 'Pelipita' es el que mayor contribución tiene en su genoma de la especie *M. balbisiana*, Shekhawat *et al.* (2011) plantean que cultivares con esta característica presentan una mayor tolerancia al déficit hídrico y de acuerdo con esto el 'Pelipita' puede ser el más tolerante de los tres cultivares trabajados. Teniendo en cuenta lo anterior es posible que con la concentración PEG-6000 utilizada no se indujera en él un estrés tal que hiciera que los valores de prolina aumentaran más de lo que lo hicieron. Además el nivel basal de prolina en las plantas sin estrés ya era mayor, incluso que las plantas de 'Grande naine' sometido a estrés.

Por otra parte, como se explicó anteriormente la prolina es un osmolito compatible que en las plantas sometidas a estrés hídrico se incrementa para garantizar la entrada y/o retención de agua en las células. Tomando esto en consideración, y además, que las plantas transgénicas del presente estudio fueron transformadas con un gen que codifica para una proteína con una función similar, es posible que los niveles del aminoácido no se hayan incrementado significativamente más que en las plantas no transformadas porque no fuese necesario, ya que la proteína AP24 estuviese desempeñando un papel positivo a favor del ajuste osmótico en la célula. Si se analizan las figuras 8 y 9 del CRA y de prolina respectivamente, puede observarse como para la línea L-4 correspondió un mayor valor en el CRA y menor en el contenido de prolina, comparada con la línea L-57 donde se observó lo contrario, esta relación inversa entre ambas variables podría explicar lo anterior.

Si se realiza una relación de los resultados del presente acápite con los discutidos en el de los indicadores morfológicos, lo sucedido con el contenido de prolina pudiera confirmar entonces que, la disminución de la altura de la planta y el número de brotes por explante, pudo constituir

una respuesta de las plantas sometidas a estrés a favor de tolerar esta condición tomando en consideración lo planteado por Valladares *et al.* (2004).

La determinación de este aminoácido, es uno de los indicadores más ampliamente utilizados para la detección de genotipos tolerantes a factores abióticos tales como salinidad, temperaturas extremas y sequía. Resultados similares a los del presente estudio han sido informados por numerosos autores al imponer a las plantas un estrés osmótico con ese objetivo (Parkhi *et al.*, 2009; Checker *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2011; Baloglu *et al.*, 2012). En plátanos y bananos, aumentos en las concentraciones de prolina en plantas sometidas a estrés, unido a la determinación de otros indicadores bioquímicos, ha permitido detectar genotipos tolerantes a sequía y salinidad, ya sea mediante transformación genética o inducción de mutaciones con agentes químicos. (Shekhawat *et al.*, 2011; Bidabadi *et al.*, 2012; Sreedharan *et al.*, 2013).

4.1.3.2 Contenido de Clorofilas totales

El contenido de clorofilas totales no mostró variaciones significativas cuando se comparan plantas sometidas a estrés con plantas no sometidas a estrés, excepto para el cultivar ‘Manzano’ en el cual sí se observó un incremento estadísticamente significativo de este indicador en las plantas tratadas con PEG-6000 (Figura 10).

Al comparar el contenido de clorofilas totales solo entre plantas sometidas a estrés, también en la figura 10 se puede observar como los mayores valores corresponden al cultivar ‘Manzano’ y a las plantas de ‘Grande naine’ no transformadas, con diferencias estadísticas significativas entre ellos. En contraste, los menores valores se obtuvieron para las plantas del cultivar ‘Pelipita’ y las líneas transgénicas del cultivar ‘Grande naine’, sin diferencias significativas entre ellos y sí con los anteriores respectivamente.

Las clorofilas en general son un indicador que se ve afectado cuando las plantas están sometidas a condiciones de déficit hídrico (Surendar *et al.*, 2013). Estas moléculas y otros pigmentos fotosintéticos se encuentran en forma de complejos pigmento-proteína principalmente en las

membranas de los tilacoides que forman las granas en los cloroplastos. Según el autor citado, el déficit hídrico provoca una desintegración en las membranas de los tilacoides, como consecuencia ocurre una degradación de los pigmentos clorofílicos, que resulta en una reducción en el contenido de clorofila en aquellas plantas que experimentan estrés por factores como la sequía y la salinidad.

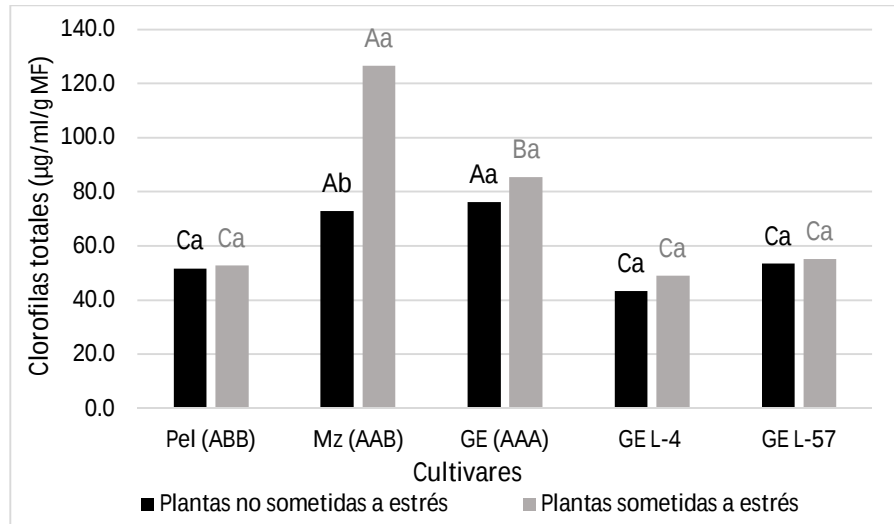


Figura 10. Contenido de clorofilas totales en plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (*Musa* ABB) y ‘Manzano’ (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano ‘Grande naine’ (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar ‘Grande naine’ transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

Otra causa de la disminución de clorofilas durante estrés por sequía es, según Ravi *et al.* (2013), que bajo esta condición se daña el mecanismo fotosintético por afectaciones en los fotosistemas I y II, y como resultado se originan electrones libres de alta energía en las hojas, esto hace que el transporte de electrones a través de los fotosistemas sea incompleto y ocurre entonces una fotooxidación de la clorofila, lo que conlleva a la pérdida de la capacidad fotosintética.

El aumento en el contenido de clorofilas totales que se observó en las plantas sometidas a estrés, significativo solo para el cultivar ‘Manzano’ es contrario a lo que debió ocurrir si se tienen en

cuenta las explicaciones anteriores. Armario *et al.* (2005) plantean que el ion central de la clorofila (Mg^{2+}) puede ser sustituido por otros iones divalentes como el Cu^{2+} , Mn^{2+} y el Zn^{2+} y la molécula mantiene el color verde, o sea, que continúa absorbiendo la luz a longitudes de onda cercanas a las que normalmente las absorbe cuando presenta el Mg^{2+} en su estructura central. Esto puede suceder producto de un daño a las membranas de los cloroplastos, ya que por un lado las moléculas de clorofila quedan libres de los complejos que forman con las proteínas, por otro, los iones pueden entrar al interior del orgánulo y ocurre entonces la sustitución en el pigmento fotosintético.

Si se tiene en cuenta que los medios de cultivo en los cuales se desarrollan las plantas *in vitro* son ricos en elementos minerales, aumenta la posibilidad de que haya ocurrido esto último en las plantas del presente experimento, por lo que el aumento observado en el contenido de este indicador pudo estar dado por un enmascaramiento del contenido de clorofilas totales en su forma nativa, por moléculas de clorofila sustituida.

De haber ocurrido el fenómeno anterior, si se analiza la figura 7 el mayor daño a las membranas de los cloroplastos, que posibilita que esto suceda, debería observarse en el cultivar 'Manzano', pues fue donde el incremento del contenido de clorofilas ocurrió de manera significativa en las plantas sometidas a estrés comparadas con las que crecieron en condiciones normales.

Lo contrario debió ocurrir en el cultivar 'Pelipita', y en la línea transgénica L-57 y L-4 donde el contenido de clorofila no varió entre plantas sometidas y no sometidas a estrés. Valladares *et al.* (2004) plantean que la estabilidad de los pigmentos fotosintéticos ha sido descrita como una estrategia de tolerancia al estrés hídrico, si se tiene en cuenta este criterio, la estabilidad en el contenido de clorofilas en estas plantas, pudiera relacionarse con una tolerancia por parte de las mismas al estrés al que fueron sometidas.

Aunque en el cultivar 'Grande naine', en las plantas no transformadas y en las de la línea transgénica no se observan diferencias significativas en el contenido de clorofilas totales entre plantas que crecieron bajo ambas condiciones respectivamente, en estas últimas si se observó

un ligero incremento del indicador, lo cual pudiera relacionarse con una menor sustitución de la molécula de clorofila, producto de un menor daño ocasionado por el estrés a las membranas de los cloroplastos de estas plantas.

Las afectaciones en el contenido de clorofilas totales en plantas sometidas a estrés hídrico, han sido también observadas por otros autores (Eltelib *et al.*, 2012; Bouaziz *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2013). En banano se han obtenido plantas tolerantes a diferentes factores abióticos que no han mostrado disminución en el contenido de clorofilas en condiciones de estrés hídrico, en comparación con plantas sensibles al mismo (Bidabadi *et al.*, 2011; Rustagi *et al.*, 2014). En estos casos, cuando se analizó el daño a las membranas celulares a través de la determinación otros indicadores bioquímicos, se pudo corroborar que las plantas en las cuales el estrés hídrico no afectó el contenido de clorofilas, fueron aquellas en las que ocurrió un menor daño a nivel de membranas celulares. Por otro lado Mahmood *et al.* (2012) también obtuvieron la misma relación inversa entre el contenido de clorofilas totales y el daño a las membranas celulares en plantas *in vitro* de banano cv. 'Berangan', sometidas a estrés hídrico con PEG-600 a la concentración de 30 g l⁻¹.

Los resultados del presente acápite muestran que la determinación del contenido de clorofilas totales si pudiera seguir siendo utilizada para la detección de plantas tolerantes al estrés hídrico *in vitro* bajo las condiciones estudiadas.

4.1.3.3 Contenido de Malondialdehído (MDA)

Se observó un aumento significativo del contenido de MDA en las plantas sometidas a estrés hídrico de los cultivares 'Manzano' y 'Grande naine' (plantas control y plantas de la línea transgénica L-4), cuando se comparan con las plantas no tratadas con PEG-6000 respectivamente (Figura 11). En las plantas del cultivar 'Pelipita' y en las de la línea transgénica L-57 del cultivar 'Grande naine' sometidas a estrés hídrico, no se observaron diferencias significativas cuando fueron comparadas con las crecidas en condiciones normales (Figura 11).

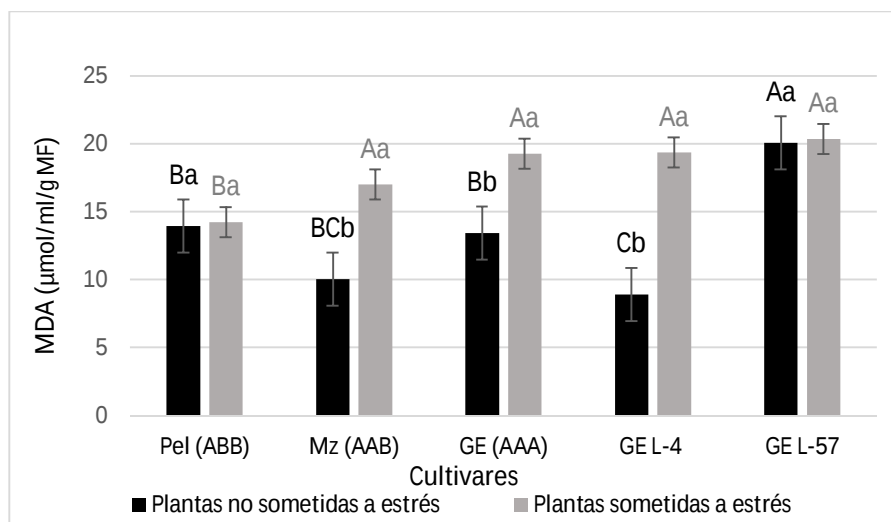


Figura 11. Contenido de malondialdehído (MDA) en plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (*Musa* ABB) y ‘Manzano’ (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano ‘Grande naine’ (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar ‘Grande naine’ transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Tukey para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Tukey para $p < 0,05$.

Al comparar solamente las plantas de todos los cultivares que crecieron bajo el déficit hídrico, los mayores valores de MDA corresponden a las del ‘Manzano’ y ‘Grande naine’ (tanto no transformadas como transformadas) sin diferencias significativas entre ellas; el menor valor corresponde a las plantas sometidas a estrés del cultivar ‘Pelipita’ con diferencias significativas con todas las anteriores respectivamente.

El MDA es un indicador de daños celulares causados por estrés oxidativo, este es el producto final de la peroxidación lipídica, proceso que hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos tras sucesivas reacciones en cadena, ocasionadas por los radicales libres generados ante situaciones de estrés. Este proceso afecta el complejo de membranas de la célula, por lo que puede incidir de manera negativa en procesos celulares tales como la respiración (cuando afecta las membranas mitocondriales) y la fotosíntesis (cuando afecta las membranas de los tilacoides en los cloroplastos) (Mahouachi *et al.*, 2005). Por tanto, aquellas plantas sometidas a estrés en

las que no se observe un incremento en los niveles de MDA, presentan una mayor capacidad para tolerar esa condición.

De acuerdo con los resultados presentados en la figura 8, la mayor afectación a las membranas celulares se evidenció en las plantas sometidas a estrés de los cultivares 'Manzano' y 'Grande naine' (plantas controles no transformadas y de la línea transgénica L-4).

En cambio, cuando son analizadas las cantidades de MDA en las plantas sometidas a estrés del cultivar 'Pelipita' y en las de la línea L-57 de 'Grande naine', los resultados demuestran que en estos casos no se produjo daño a nivel de membranas celulares producto del estrés oxidativo causado por el déficit hídrico. Este resultado podría indicar una tolerancia de esta línea al estrés impuesto ya que respondió de igual manera que lo hizo el cultivar tolerante que mejores resultados ha mostrado.

Cuando se analiza el contenido de clorofilas totales discutido en el acápite anterior, tanto en las plantas del cultivar 'Pelipita', así como en las de la línea L-57 sometidas a estrés no se observaron variaciones comparadas con las no tratadas con PEG-6000. En estos dos casos se asumió que esta respuesta pudo deberse a que no existió un daño a nivel de membranas de cloroplasto que provocara la oxidación de la clorofila, esto lo confirma el resultado del presente acápite.

Por otro lado, también se discutió en el acápite anterior que el aumento observado en el contenido de clorofilas totales en las plantas del cultivar 'Manzano' sometidas a estrés, pudo deberse a que, producto de un daño en las membranas de los cloroplastos, el ion central de la molécula de clorofila se sustituyera por otros iones que pudieran penetrar al interior del orgánulo, y el contenido real de clorofilas en su forma nativa se enmascarara por moléculas de clorofila sustituida. Esta explicación pudiera ser corroborada con los resultados del presente acápite para este cultivar, en el que se observó un incremento significativo en los niveles de MDA de las plantas sometidas a estrés comparadas con las plantas no tratadas con PEG-6000, lo que indica que sí ocurrió un daño a nivel de membranas.

De igual manera que para el cultivar 'Manzano', en el cultivar 'Grande naine' se observó, en las plantas controles no transformadas y en las transgénicas de la línea L-4 sometidas a estrés, un incremento significativo del contenido de MDA comparadas con las no sometidas a estrés (Figura 11); sin embargo, para estas plantas del cultivar 'Grande naine' el incremento en el contenido de clorofilas no fue significativo como ocurrió en el ejemplo anterior con el cultivar 'Manzano' (Figura 10). Es posible que el contenido de MDA se haya elevado como consecuencia del daño a la membrana externa de la célula y/o a otras membranas simples, y las membranas de los cloroplastos que son dobles y presentan una estructura más compleja no hayan sufrido un daño tal como para que el contenido de clorofilas se viese afectado.

Teniendo en cuenta lo anterior pudiera asumirse que las plantas de la línea L-4 no toleraron el estrés de la misma manera que lo hicieron las de la línea L-57, pero no resultaron ser tan sensibles como las del cultivar 'Manzano'.

4.1.3.4 Contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se observó un incremento significativo del contenido de H_2O_2 en las plantas sometidas a estrés de los cultivos 'Manzano' y 'Grande naine' (plantas controles y plantas de la línea transgénica L-4), cuando se comparan con las plantas no tratadas con PEG-6000 respectivamente. El mayor incremento correspondió al cultivar 'Manzano'. En las plantas del cultivar 'Pelipita' y en las de la línea transgénica L-57 del cultivar 'Grande naine' sometidas a estrés, no se observaron diferencias significativas cuando son comparadas respectivamente con las crecidas en condiciones normales (Figura 12).

Cuando se comparan solamente plantas sometidas a estrés de cada cultivar los mayores valores corresponden al 'Manzano' seguido por el cultivar 'Grande naine' (plantas controles no transformadas y plantas de la línea transgénica L-4) sin diferencias significativas entre ellos respectivamente. En las plantas de 'Pelipita' y en las de la línea L-57 de 'Grande naine' se observaron los menores valores sin diferencias significativas entre ellas, ni de estas dos con las

transformadas de la línea L-4. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las plantas del cultivar 'Grande naine' transformadas y no transformadas. Además, el contenido de este indicador fue significativamente menor en el cultivar 'Pelipita' que en el 'Manzano' y 'Grande naine' no transformado respectivamente.

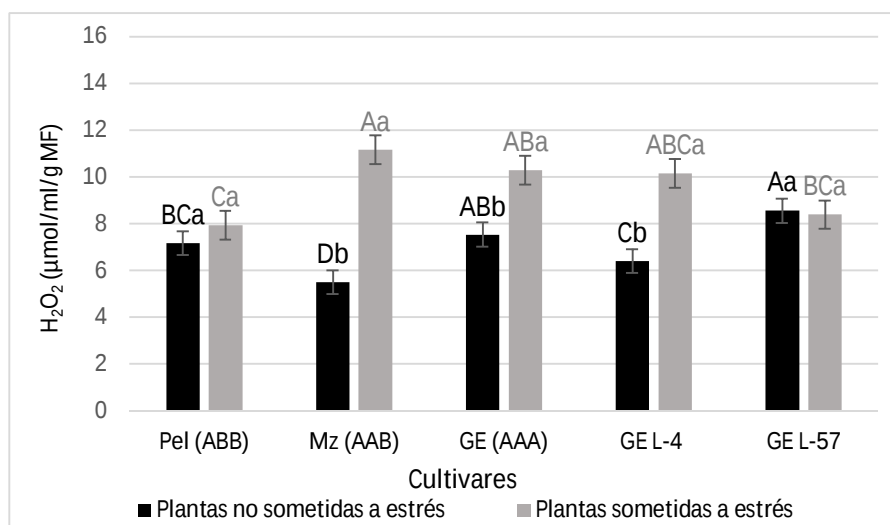


Figura 12. Contenido de Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp., sometidos y no sometidos (tratamientos) a estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano 'Pelipita' (*Musa* ABB) y 'Manzano' (*Musa* AAB), GE: cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa* AAA), GE L-4 y GE L-57: Líneas transgénicas del cultivar 'Grande naine' transformadas con el gen de osmotina *ap24*. Letras mayúsculas no comunes sobre barras, indican diferencias significativas entre cultivares para un mismo tratamiento por prueba de Tukey para $p < 0,05$; letras minúsculas no comunes indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Tukey para $p < 0,05$.

El H_2O_2 está considerado como una ROS conjuntamente con el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH^\cdot$) y el oxígeno en estado de singlete (1O_2) (Rai *et al.*, 2011). En condiciones normales las células vegetales producen ROS continuamente como subproductos de varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos celulares (cloroplastos, mitocondrias y microcuerpos) (Tadeo y Gómez-Cárdenas, 2008), pero a un nivel bajo en el que son rápidamente eliminadas por los diferentes sistemas antioxidantes y no provocan daño celular. En condiciones de estrés la producción de ROS se eleva drásticamente y causa daños en las diferentes

biomoléculas estructurales de la célula (Apel y Hirt, 2004). Además es utilizado por los organismos como sistema de señalización para la defensa (Hung, *et al.*, 2005).

El H_2O_2 se produce a partir del $\text{O}_2^\cdot$ por la acción de la enzima SOD que actúa como primera línea de defensa a nivel celular cuando existen condiciones de estrés oxidativo. Este producto ocasiona daños al ADN, a las proteínas y a los lípidos de las membranas a través de fenómeno de peroxidación lipídica que rinde como producto final el MDA (Rai *et al.*, 2011). Por tanto un aumento significativo del contenido de H_2O_2 en las células por encima de los niveles normales, podría estar asociado al daño celular y además pudiera indicar daño a nivel de membranas.

Teniendo en cuenta lo anterior, el incremento en el contenido de H_2O_2 observado en las plantas sometidas a estrés del cultivar 'Manzano', y en las del cultivar 'Grande naine' controles no transformadas, y transformadas de la línea L-4, indica que ocurrió un mayor estrés oxidativo que pudo resultar en un mayor daño a las membranas celulares; esto último lo puede corroborar el aumento en el contenido de MDA discutido en el acápite anterior, significativo solamente para estos tres casos (Figura 8).

Contrario a lo sucedido en las variables evaluadas anteriormente, en las plantas del cultivar 'Pelipita' y en las de la línea transgénica de 'Grande naine' L-57, no se observó incremento significativo de H_2O_2 en las plantas sometidas a estrés comparadas con las crecidas en condiciones normales, esto pudo deberse a la acción de los sistemas antioxidantes de la célula que permitieron esta respuesta positiva por parte de estas plantas en función de tolerar el estrés. Según Moreno (2009) Durante el estrés hídrico se sobreexpresan en la célula un grupo de enzimas antioxidantes que, junto con compuestos no proteicos, detoxifican a las plantas de los radicales libres como el $\text{O}_2^\cdot$ y el H_2O_2 ; aunque esta cuestión ya fue abordada con anterioridad en el capítulo de Revisión Bibliográfica, cabe recordar que entre las principales enzimas que tienen esta función están la SOD, la APX, la Glutación Peroxidasa (GPX), la GR, la MDAR, la CAT y la POD (Apel y Hirt, 2004). Estas moléculas proteicas tienen como función eliminar el H_2O_2

producido inicialmente por la SOD. De todas ellas la APX es la peroxidasa más importante que cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O con el uso del poder reductor del ascorbato, en el ciclo del Agua-Agua que ocurre en los cloroplastos. Las demás enzimas actúan en reacciones intermedias de otros ciclos (Ascorbato-Glutatión, Glutatión-Peroxidasa) que tienen lugar en otros compartimentos celulares (cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, citosol, apoplasto) y rinden productos finales como el O_2 , NAD(P)^+ y H_2O (Rai *et al.*, 2011).

Por tanto, una acción positiva de estas enzimas con la finalidad de eliminar el daño celular por el estrés impuesto a las plantas, unido a que no aumentaron los niveles de MDA ni se afectaron los de clorofilas totales en las plantas sometidas a estrés de la línea L-57 del cultivar 'Grande naine' y en las del cultivar 'Pelipita', pudiera indicar una tolerancia por parte de estas plantas al estrés hídrico inducido con PEG-6000 en condiciones *in vitro*.

Una respuesta similar ha sido observada en plantas de plátanos, bananos y otros cultivos sometidas también a estrés hídrico. Por ejemplo, Annon *et al.* (2014) observaron bajos contenidos de MDA y H_2O_2 en plantas de zanahoria transformadas con un gen de osmotina de tabaco comparadas con plantas no transformadas que crecieron en presencia del estrés. Esto, junto con la determinación de otros indicadores permitió llegar a la conclusión de que la proteína expresada ejerció un papel protector contra las condiciones de estrés hídrico impuestas a las plantas para lograr tolerancia a este factor. Por otra parte, Parkhi *et al.* (2009) llegaron a la misma conclusión al observar igualmente bajos contenidos de MDA y H_2O_2 en plantas de algodón transformadas también con un gen de osmotina. De igual manera, Xu *et al.* (2014) obtuvieron tolerancia a la sequía en plantas *in vitro* de *A. thaliana* transformadas con el gen de acuaporina *MaPIP1;1* de *M. acuminata*, y relacionaron esta tolerancia con una disminución en los niveles de MDA en las plantas transformadas. En el cultivar de plátano 'Rasthali', Shekhawat *et al.* (2011) también obtuvieron plantas tolerantes a la sequía en condiciones *in vitro* a través de la transformación con el gen *MusaDHN-1* que codifica para una dehidrina, en este caso las plantas

transgénicas no mostraron aumentos en los contenidos de MDA cuanto fueron sometidas a estrés hídrico con PEG-6000.

En el presente estudio, el cultivar 'Manzano' con genotipo AAB, mostró afectaciones en la mayoría de los indicadores medidos, sobre todo en los bioquímicos para los cuales el 'Pelipita' y la línea transgénica L-57 de 'Grande naine' no mostraron daño. Algunos autores refieren que en el género *Musa* aquellos cultivares en cuyo genotipo se encuentra la contribución de la especie *M. balbisiana* L. son a los que se les atribuye algún grado de tolerancia al déficit hídrico (Simmonds, 1966; Mahmood *et al.*, 2012). Sin embargo Ravi *et al.* (2013) dentro del grupo genómico AAB, ubica cultivares susceptibles y moderadamente tolerantes. Es posible que el cultivar 'Manzano' sea uno de esos cultivares de este grupo que presente sensibilidad a la escases de agua,

La tolerancia al estrés abiótico es una característica que debe ser atribuida no solamente a un factor, proceso celular o indicador de daño por estrés, sino, a la combinación de varias respuestas emitidas por las plantas que indiquen que son capaces de no resultar dañadas ante la condición impuesta, y que bajo la misma, aun cuando se afecten algunos parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, se pueda mantener la homeostasis.

Algunas de las variables empleadas en el presente estudio (masa seca, contenido de clorofilas totales, contenido de peróxido de H₂O₂ y contenido de MDA) pueden seguir siendo utilizadas en trabajos posteriores para la detección de plantas transgénicas tolerantes al estrés por sequía. No obstante, la determinación de otras como el contenido relativo de agua y el contenido de prolina se pudiera seguir teniendo en cuenta bajo otras condiciones, o con variaciones en el método empleado en el presente trabajo, ya que ambas se incluyen dentro de las más utilizadas en trabajos similares.

Los resultados obtenidos para las líneas transgénicas del cultivar 'Grande naine' sugieren tolerancia por parte de las mismas a la escasez de agua en condiciones *in vitro*, no obstante

resultaría conveniente probar esta tolerancia en otras condiciones, como por ejemplo la fase de aclimatización. En condiciones *ex vitro* sobre las plantas influyen otros factores ambientales semejantes al campo, para la evaluación, además de las variables que se sugieren se podrían tener en cuenta otras, relacionadas con procesos que en este nuevo ambiente ya se realizan de una manera más activa, como la apertura y cierre de los estomas y la fotosíntesis. Llevar a cabo este tipo de evaluaciones en un ambiente semicontrolado resultaría muy práctico pues se debe tener en cuenta que la finalidad de un programa de mejoramiento genético en general, es la inserción en el campo de los genotipos, variedades o cultivares obtenidos, para dar solución a una problemática agrícola específica.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- 1- Las variables masa seca, contenidos de clorofilas totales, malondialdehído y peróxido de hidrógeno, permitieron diferenciar en plantas *in vitro* del cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA) transformadas con el gen *ap24*, la tolerancia al estrés hídrico inducido con PEG 6000.
- 2- Las variables morfológicas altura de la planta y número de brotes por explante, las fisiológicas masa fresca y contenido relativo de agua, y la bioquímica contenido de prolina, al ser analizadas de manera aislada, no permitieron diferenciar en plantas *in vitro* del cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA) transformadas con el gen *ap24*, la tolerancia al estrés hídrico inducido con PEG 6000.
- 3- Las plantas del cultivar 'Pelipita' (*Musa* ABB) mostraron mayor tolerancia que las del 'Manzano' (*Musa* AAB) y del 'Grande naine' (*Musa* AAA) no transformadas, al estrés hídrico inducido con PEG 6000 en condiciones *in vitro*.

Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

- 1- Utilizar las variables bioquímicas y la variable fisiológica masa seca para seleccionar líneas transgénicas del cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa AAA*) transformadas con el gen de osmotina *ap24*, tolerantes a la sequía en la fase de cultivo *in vitro*.
- 2- Evaluar el contenido relativo de agua en futuros experimentos empleando hojas de plantas en lugar de plantas completas.
- 3- Emplear para futuros experimentos otras variables indicadoras de tolerancia a la sequía, como por ejemplo la determinación de fósforo inorgánico, conductividad eléctrica de las membranas celulares y pérdida de electrólitos a través de las mismas, y determinación de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas ante el estrés oxidativo.
- 4- Evaluar la tolerancia a la sequía en condiciones de fase de aclimatización y campo, de las líneas seleccionadas en el presente estudio como tolerantes al déficit hídrico.

Referencias Bibliográficas

- Abad, LR, M Paino, D Liu, ML Narasimhan, M Reuveni, JK Zhu, X Niu, NK Singh, PM Hasegawa, RA Bressan (1996) antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* 118:11-23.
- Afza, R, M. Van-Duren, R Morpurgo (1996) Bananas Tissue Culture and its prospective Use in the Developing Countries. En: *Plant Tissue culture*. Islam, A.S. (Ed.). Oxford y IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi. Calcuta.pp.58-70.
- Ahmad, R, YH Kim, MD Kim, SY Kwon, K Cho, HS Lee, SS Kwak (2010) Simultaneous expression of choline oxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in potato plant chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* 138:520-533.
- Annon, A, K Rathore, K Crosby (2014) Overexpression of a tobacco osmotin gene in carrot (*Daucus carota* L.) enhances drought tolerance. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 50:299-306.
- Apel, K, y H Hirt (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Argentel L, LM González, C Ávila, R Aguilera (2006) Comportamiento del contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos fotosintéticos de variedades de trigo cultivadas en condiciones de salinidad. *Plant Physiol* 33:217-220.
- Armario, DA, S Torres, O Rodríguez, A Mollineda (2005) Causa de la aparición de la mancha verde en el tabaco (*Nicotiana tabacum*). *Centro Agrícola.* 32(2):41-45.
- Arnon, DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Asada, K, K Kiso, K Yoshikawa (1984) Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol. Plant Cell Physiol.* 25:1169–1179.

- Bae, EK, H Lee, JS Lee, EW Noh. (2009). Differential expression of a poplar SK2-type dehydrin gene in response to various stresses. *BMB Rep.* 42:439-443.
- Baloglu, MC, M Kavas, G Aydin, HA Oktem, AM Yucel (2012) Antioxidative and hysiological responses of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars under PEG-mediated drought stress. *Turk. J. Bot.* 36:707-714.
- Bates, LS (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Belalcázar, S (1991) El cultivo de plátano en el trópico. ICA. Cali, Colombia.
- Bidabadi, SS, M Mahmood, S Meon, Z Wahab, C Ghobadi (2011) Evaluation of *in vitro* water stress tolerance among EMS-Induced Variants of banana (*Musa* spp., AAA), using Morphological, Physiological and moleculat traits. *J. Crop. Sci. Biotech.* 14(4):255-263.
- Bidabadi, SS, M Mahmood, B Baninasab, C Ghobadi (2012) Influence of salicylic acid on morphological and physiological responses of banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tips to *in vitro* water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Omics Journal* 5(1):33-39.
- Bouaziz, D, J Pirrello, M Charfeddine, A Hammami, R Jbir, A Dhieb, M Bouzayen, R Gargouri-Bouزيد (2013) Overexpression of *StDREB1* Transcription Factor Increases Tolerance to Salt in Transgenic Potato Plants. *Mol. Biotechnol.* 54:803-817.
- Chai, TT, NM Fadzillah, M Kusnan, M Mahmood (2005) Water stress-induced oxidative damage and antioxidant response in micropropagated banana plantlets, *Biología Plantarum* 49(1):153-156. Doi: 10. 1007/s00000-005-3156-9.
- Champion, J (1969) El plátano. Colección Agricultura Tropical. Madrid, Edit. Blume, 247p

- Checker, VG, AK Chhibbar, P Khurana (2011) Stress-inducible expression of barley *Hva1* gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. Transgenic Res. doi: 10.1007/s11248-011-9577-8.
- Chinnusamy, V, A Jagendorf, JK Zhu (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science 45(2):437-448.
- Chong-Pérez (2012) Strategies for generating marker-free transgenic banana plants based on the Cre-lox site-specific recombination system. Tesis en opción el Título de Doctor en Ciencias Bioingenieril. Brussel, Bélgica, Vrije Universiteit Brussel, Faculty of Science and Bio-engineering Sciences.155p.
- Cronquist, A (1988) The evolution and classification of flowering plants. Segunda edición. USA
- Das, M, H Chauhan, A Chhibbar, Q Mohd, R Haq, P Khurana (2011) High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. Transgenic Res. 20:231-246.
- Deikman, J, M Petracek, JE Heard (2012) Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers fields. Current opinion in Biotechnology 23:243:250.
- Demmig-Adams, B y W Demmig-Adams (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1:21-26.
- Díaz, P, O Borsani, J Monza (1999) Acumulación de prolina en plantas en respuesta al estrés osmótico. Agrociencia 3(1):1-10
- Ehsanpour, AA y R Razavizadeh (2005) Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) C. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 1(2):107-110.
- Eltileb, HA, Y Fujikawa, M Esaka (2012) Overexpression of the acerola (*Malpighia glabra*) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased

ascorbate levels and enhanced tolerance to salt stress. S. Afr. J. Bot.
doi:10.1016/j.sajb.2011.08.005

FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponible en:
<http://faostat.fao.org> (Consultado 12 de Junio del 2015).

Green, FA (1966) To lipid metabolism - a fundamental feature in tummer-hostü relationship. J.
Theor. Biol. 2:213-215.

Hare, P, W Cress, J Van Staden (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during
stress. Plant Cell Enviroment 21:535-553.

Henry, IM, SC Carpentier, S Pampurova, A Van Hoylandt, B Panis, R Swennen, S Remy (2011)
Structure and regulation of *Asr* gene family in banana. Planta 234:785-798.

Huang, X, G Wang, Y Shen, Z Huang (2012) The wheat gene *TaST* can increase the salt
tolerance of transgenic *Arabidopsis*. Plant Cell Rep. 31:339-347.

Hung, S, H Yu, CW Lin (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull.*
Acad. Sin. 46:1-10.

Husaini, AM, MZ Abdin (2008) Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*
Duch.) plants tolerant to salt stress. Plant Science. 174:446-455.

Jacobs, A, K Ford, J Kretschmer, M Tester (2011) Rice plants expressing the moss sodium
pumping ATPase PpENA1 maintain greater biomass production under salt stress. Plant
Biotechnology Journal 9:838-847.

Jaleel, CA, K Riadh, R Gopi, P Manivannan, J Ines, HJ Al-Juburi, Z Chang-Xing, S Hong-Bo, R
Panneerselvam (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants
under abiotic constraints. Acta Physiol Plant 31(3):427-436.

- Janero, DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic.Biol .Med.* 9:515-540.
- Joshi, R, MV Ramanarao, N Baisakh (2013) Arabidopsis plants constitutively overexpressing a myo-inositol 1-phosphate synthase gene (*SalNO1*) from the halophyte smooth cordgrass exhibits enhanced level of tolerance to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 65:61-66
- Kallarackal, J, JA Milburn, DA Baker (1990) Water Relations of the Banana. Effects of Controlled Water Stress on Water Potential, Transpiration, Photosynthesis and Leaf Growth. *Functional Plant Biology* 17(1):79-90.
- López, ZM (1989) El plátano. Editorial Pueblo y educación. La Habana, Cuba.
- Mahmood, M, SS Bidabadi, C Ghobadi, DJ Gray (2012) Effects of methyl jasmonate treatment on alleviation of polyethylene glycol-mediated water stress in banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tip cultures. *Plant Growth Regul.* 68:161-169.
- Mahouachi, J, A Gómez-Cadenas, E Primo-Millo, M Talón (2005) Antagonistic Changes between Abscissic Acid and Gibberellins in Citrus Fruits Subjected to a Series of Different Water Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:179-187.
- Marín, D, T Sutton, A Barrer (2002) Diseminacion del babano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus Similis*. *Manejo Intergrado de Plagas y Agroecología.* 66:62-75.
- Milburn, MV, L Tong, A Brunger, Z Yamaizumi, S Nishimura, SH Kim (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, 247(4945):939-945.
- Mittler, R, S Vanderauwera, N Suzuki, G Miller, VB Tognetti, K Vandepoele, M Gollery, V Shulaev, F Van Breusegem (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16:300-309.

- Mohamed, MAH, PJC Harris, J Henderson (2000) In vitro selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. Plant Sci.159:213-222.
- Mohd, RI, MK Yusoff, M Mahmood (2004) Growth, water relations, stomatal conductance and proline concentration in water stressed banana (*Musa* spp.) plants. Asian Journal of Plant Sciences 3(6):709-713.
- Moreno-Bermúdez, LJ, R Gómez-Kosky, M Reyes, C Mbabazi, B Chong-Pérez (2014) Respuesta de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) al estrés hídrico inducido con polietilenglicol. Biotecnología Vegetal 14(1):21-27.
- Moreno, L, S Crespo, W Pérez, LM Melgarejo (2010) Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. En: Melgarejo LM (Ed.) Experimentos en fisiología vegetal, pp. 187-248. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Moreno, LP (2009) Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. Agronomía Colombiana 27(2):179-191.
- Müller, M y S Munné-Brosch (2015) Ethylene response factors (ERFs): a key regulatory hub in hormone and stress signalin. Plant Physiology Preview. doi:10.1104/pp.15.00677.
- Munné-Bosch, S, G Queval, CH Foyer (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. Plant. Physiol. 161:5-19.
- Munns, R, M Tester (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant. Biol. 59: 651-681.
- Munns, R y Prometheus Wiki contributors (2010) Plant water content and relative water content. Prometheus wiki. En: [http://www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.php?page=Plant water content and relative water content&preview=6](http://www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.php?page=Plant+water+content+and+relative+water+content&preview=6). Consultado el 26 de Junio de 2015.

Murashige, T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497

MusaDOC (2000) International Network for the improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Parc scientifique Agropolis. Montpellier, Francia. Disco compacto. ISBN: 2-910810-39-9.

Nakano, Y K y Asada (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867-880.

Neill, S, R Desikan, J Hancock (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:388-395.

Nilsen, ET y DM Orcutt (1996). *Physiology of plants under stress. Abiotic factors.* John Wiley and Sons, New York, NY.

Orellana PP. (1998). Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (Ed). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*, pp.151-177. IBP, Santa Clara.

Paleg, Z, E Blumwald (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(3):290-295.

Parkhi, V, V Kumar, G sunilkumar, LAM Campbell, NK Singh, KS Rathore (2009) Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. *Mol. Breeding* 23:625:639.

Patel, J, LE McLeod, RGJ Vries, A Flynn, X Wang, CG Proud (2002) Cellular stresses profoundly inhibit protein synthesis and modulate the states of phosphorylation of multiple translation factors. *Eur. J. Biochem.* 269:3076-3085.

Pérez, JN (1994). Proyecto de estudio, evaluación, métodos de control y selección de la variabilidad somaclonal en el género *Musa*. IBP. Santa clara.

- Porra, RJ, WA Thompson, PE Kriedemann (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.* 975:384–394.
- Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez, K.J. Palme y M.A.K. Jansen (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12(3):99-105.
- ProMusa (2014) 'Grande naine'. Disponible en: <http://www.promusa.org/tiki-index.php?page=Grande+Naine#Drought> (Consultado 12 de Junio del 2015).
- Rai, MK, RK Kalia, R Singh, MP Gangola, AK Dhawan (2010) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection-An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.* doi:10.1016/j.envexpbot.2010.10.021.
- Ravi, I, S Uma, MM Vaganan, MM Mustaffa (2013) Phenotyping bananas for drought resistance. *Front. Physio.* 4:9. doi: 10.3389/fphys.2013.00009.
- Robinson, J (1996) Bananas and plantains. Crop production science in horticulture series. CAB International University press, Cambridge, UK.238p.
- Rodríguez, W y D Leihner (2006) Análisis del crecimiento vegetal. Villalobos RE (Ed). Primera edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 37p.
- Rustagi, A, S Jain, D Kumar, S Shekhar, M Jain, V Bhat, NB Sarin (2014) High Efficiency Transformation of Banana [*Musa acuminata* L. cv. Matti (AA)] for Enhanced Tolerance to Salt and Drought Stress Through Overexpression of a Peanut Salinity-Induced Pathogenesis-Related Class 10 Protein. *Mol Biotechnol* doi: 10.1007/s12033-014-9798-1.
- Sandoval, J, L Müller (1999) Anatomía y morfología de planta de banano (*Musa* AAA). *Corbana* 24(51):43-60.

- Sevilla, CL, NH Mahle, N Eliezer, A Uzieblo, SM O'Hara, M Nokubo, R Miller, CA Rouzer, LJ Marnett (1997) Development of monoclonal antibodies to the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, pyrimidopurinone. *Chem Res Toxicol* 10:172-180.
- Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel y C.X. Zhao. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biol.* 331:215-225.
- Shekhawat, UKS, TR Ganapathi, L Srinivas (2011) *MusaDHN-1*, a novel multiple stress-inducible SK3-type dehydrin gene, contributes affirmatively to drought- and salt-stress tolerance in banana. *Planta* 234:915–932.
- Shekhawat, U, K Surendar, TR Ganapathi (2013) Transgenic banana plants overexpressing *MusabZIP53* display severe growth retardation with enhanced sucrose and polyphenol oxidase activity. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* doi: 10.1007/s11240-013-0414-z.
- Shinozaki, K y K Yamaguchi-Shinozaki (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58(2):221-227.
- Simmonds, NW (1966) Bananas. Segunda edición. Longmans, Green London. 535p. Singh NK, Nelson DE, Kuhn D, Hasegawa PM, Bressan RA (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol* 90:1096-1101.
- Simmonds, NW (1987) The taxonomy and characterization of cultivated bananas. London.
- Soto, M. (1985). Bananos: Cultivo y comercialización. Costa Rica.
- Sreedharan, S, UKS Shekhawat, TR Ganapathi (2013) Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *MusaPIP1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnol.* 11:942-952.

- Stepanova, AN y JM Alonso (2005) Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiologia Plantarum* 123(2):195-206.
- Stover, R, NW, Simmonds (1987) Somaclonal Variation in Grand Naine and Saba bananas in the nursery and field. En: Parsley GJ and De Langhe E (Eds) Bananas and plantain breeding strategies. p187. Aciar Proceedings. Australia.
- Surendar, KK, DD Devi, I Ravi, P Jeyakumar, SR Kumar, K Velayudham (2013) Studies on the Impact of Water Deficit on Plant Height, Relative Water Content, Total Chlorophyll, Osmotic Potential and Yield of Banana (*Musa spp.*) Cultivars and Hybrids. *Int. Jour. Hortic.* 3(11):52-60.
- Tadeo, FR, A Gómez-Cárdenas (2008) Fisiología de las plantas y el estrés. En: Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda edición. Azcón-Bieto, J y M Talón (Eds). pp:577-596. McGRAW-HILL INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U. Madrid.
- Tai, FJ, ZL Yuang, XL Wu, PF Zhao, XL Hu, W Wang (2011) Identification of membrane proteins in maize leaves, altered in expression under drought stress through polyethylene glycol treatment. *Plant Omics Journal* 4(5):250-256.
- Taiz, L. y E. Zeiger. (2006). *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Shinozaki, K. y K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58(2):221-227.
- Talón, M, FR Tad, JAD Zeevaart (1991) Cellular changes induces by exogenous and endogenous giberellins in the shot tips of the long-day plant silene armería. *Planta* 185:487-493.
- Uga, Y, K Sugimoto, S Ogawa, J Rane, M Ishitani, N Hara, Y Kitomi, Y Inukai, K Ono, N Kanno, H Inoue, H Takehisa, R Motoyama, Y Nagamura, J Wu, t Matsumoto, T takai, K Okuno, M Yano (2013) Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* uncreases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics* 45(9):1097-1105.

- Valentovic, P, M luxova, L Kolarovic, O Gasparikova (2006) Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soli Environ.* 52(4):186-191.
- Valladares, F, A Vilagrosa, J PeñuelaS, R Ogaya, JJ Camarero, L Corcuera, S Sisó, E Gil-Pelegrín (2004) Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. En: *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Valladares, F. (Ed) pp163-190. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid.
- Van Asten, PJA, AM Fermont, G Taulya G (2011) Drought is a major yield loss factor forrain fed East African high land banana. *Agric. Water Manag.* 98:541–552.
- Vanhove, AC, W Vermaelen, B pains, R Swennen, SC Carpentier (2012) Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an in vitro growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. *Front. Plant Sc.* 3:1-10.
- Vidal, AM (2010) Respuestas fisiológicas de cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. Tesis doctoral para optar por el grado de Doctor en Ingeniería Agrónoma. Castellón de la Plana, España, Universitat Jaume I de Castellón, Departamento de ciencias agrarias y del medio ambiente. 196p.
- Vinocur, B y A Altman (2011) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in Biotechnology* 16:123-132.
- Wang, F, B Zeng, Z Sun, C Zhu (2009) Relationship between proline and Hg⁺²-induced oxidative stress in tolerant rice mutant. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56(4):723–731. doi: 10.1007/s00244-008-9226-2.
- Wareing, PF y IDJ Phillips (1970) *The control and development in plants*. Pergamon Press. Oxford pp1-21.

- Wojtaszek, P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322:681-692.
- Xu, Y, J liu, J Zhang, C Jia, H Miao, B Xu, Z Jin (2014) A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *Plant Biol.* 14:1-14.
- Yin, C, Y Peng, R Zang, Y Zhua, C Lia (2005) Adaptive responses of *Populus kangdingensis* to drought stress. *Physiologia Plantarum* 123:445-451.
- Zeevaart, JAP, DA Gade, M Talón (1993) pasado y presente de la citricultura española. Generalitat Valenciana. Serie divulgación técnica, Nº8, Valencia España.
- Zhou, S, W Hu, X Deng, Z Ma, L Chen, C Huang, C Wang, J Wang, Y He, G Yang, G He (2012) Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS. One* 7:e52439.
- Zhu, JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53:247-273.