

*Tesis presentada en opción al grado académico de Master en
Biotecnología Vegetal*

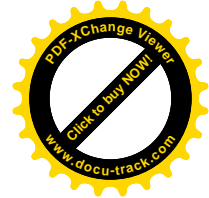
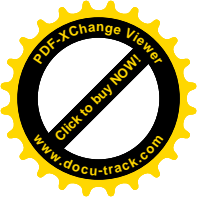
**Titulo: Evaluación morfológica, agronómica y molecular
mediante AFLP en plantas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21'
regeneradas por Embriogénesis Somática.**

Autora: Ing. Miladys León Quintana

Tutor: Dr.C. Luis Antonio Barranco Olivera

Consultante: MSc. Leyanis García Águila

*Santa Clara, CUBA
2008*



Dedicatoria

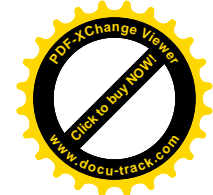
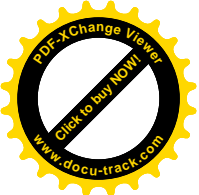
A mi padre.

A mis hijos.

A mi esposo.

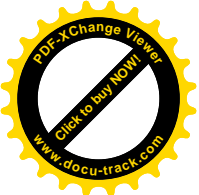
A mi hermana querida

A mi familia en general por el apoyo brindado durante esta etapa de desarrollo profesional.



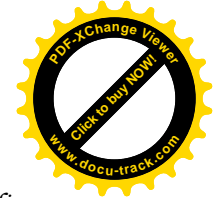
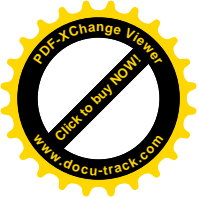
Agradecimientos

Solo los que han tenido la oportunidad de realizar un trabajo de esta índole comprenden cuán difícil resulta el mismo. El resultado de este trabajo ha sido posible gracias a las sugerencias y conducción de un grupo de personas, los cuales tienen el mérito de sentirlo suyo al igual que yo. Ellos son: Leyanis García Águila, Yelenys Alvarado Capó, Nydia del Rivero Bautista, Aminael Sánchez Rodríguez, Lourdes García Rodríguez, Novisel Veitía Rodríguez, María Ileana Oloris Ortega y Luis Rojas Jiménez, a los compañeros del laboratorio de Biología Molecular y a todos los compañeros del área de producción.



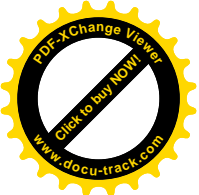
RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar variaciones somaclonales en plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) a través la evaluación morfológica, agronómica y molecular mediante AFLP. Para ello, se evaluaron en casa de cultivo las plantas con cambios fenotípicos regeneradas de embriones somáticos utilizando como control plantas procedentes de organogénesis. La evaluación en campo de las plantas se realizó a través de caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares (AFLP), para ello se utilizaron como controles plantas procedentes de organogénesis y semilla asexual. Como resultado se obtuvo que el porcentaje de cambios fenotípicos en las plantas regeneradas por embriogénesis somática fue menor respecto a las plantas de organogénesis, detectables en casa de cultivo. Se corroboró, que los porcentajes de variación somaclonal en las plantas regeneradas de embriones somáticos son bajos (0,02%) durante el ciclo de cultivo en campo. Los mejores resultados en las variables agronómicas (peso del racimo, número de manos/racimo y número de frutos/mano) se obtuvieron en las plantas procedentes del cultivo *in vitro* (embriogénesis y organogénesis). Por otra parte, los resultados con los marcadores moleculares AFLP para las combinaciones de cebadores estudiadas no indicaron variaciones genéticas. Por tanto, los resultados de este trabajo nos permiten validar la embriogénesis somática para la propagación masiva *in vitro* del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21'.

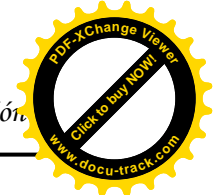
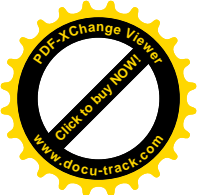


ÍNDICE

1.	INTRODUCCION	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Origen del género Musa, descripción botánica y taxonómica.	5
2.2	Importancia del género Musa y situación en Cuba.	6
2.3	Caracterización del cultivar híbrido de plátano FHIA-21 (Musa AAAB).	7
2.4	Generalidades de la propagación <i>in vitro</i> del género Musa.	9
2.4.1	Organogénesis.	10
2.4.2	Embriogénesis somática.	11
2.4.3	Variación somaclonal.	12
2.4.3.1	Origen de la variación en Musa spp.	14
2.4.3.2	Tipos de variantes somaclonales en Musa spp.	15
2.5	Técnicas utilizadas para evaluar la variación genética en Musa spp.	17
2.5.1	Marcadores morfológicos.	18
2.5.2	Marcadores bioquímicos o proteicos.	19
2.5.3	Marcadores moleculares o de ADN.	20
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	Evaluación en casa de cultivo de cambios fenotípicos y supervivencia de plantas regeneradas por embriogénesis somática.	25
3.2	Evaluación en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. híbrido FHIA 21.	26
3.3	Evaluación en campo de caracteres morfológicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.	27
3.4	Evaluación en campo de caracteres agronómicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.	28
3.5	Caracterización molecular mediante AFLP de las plantas regeneradas por embriogénesis somática.	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	Evaluación en casa de cultivo de cambios fenotípicos y supervivencia de plantas regeneradas por embriogénesis somática.	34
4.2	Evaluación en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA 21'.	38



4.3	Evaluación en campo de caracteres morfológicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.	38
4.4	Evaluación en campo de caracteres agronómicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.	43
4.5	Caracterización molecular mediante AFLP de las plantas regeneradas por embriogénesis somática.	46
5.	CONCLUSIONES	51
6.	RECOMENDACIONES	52
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

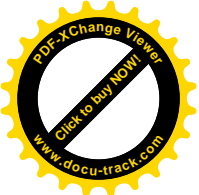


1. INTRODUCCION

La producción estimada de banano y plátanos a nivel mundial es de 108 millones de toneladas métricas por año, de las cuales el 68% corresponde a banano y el 32% a plátano. Se considera, además, que el 82% de la producción total es consumido internamente por los habitantes de los países productores y solo el 18% es destinado a la exportación. Esto indica que son un componente importante en la alimentación de millones de personas en el mundo (FHIA, 2007).

En Cuba el consumo de banano y plátanos por sus habitantes es elevado debido a que son parte esencial en su dieta alimenticia. Con la llegada de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en la década del 90, del siglo XX, se afectó severamente la producción local de plátano y banano (FHIA, 2007). Es por ello, que la introducción de nuevos genotipos resistentes a plagas y enfermedades constituye una prioridad, junto con el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* que permitan aumentar de forma rápida los niveles de producción con menos costos.

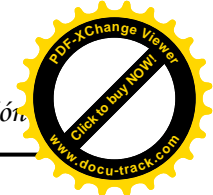
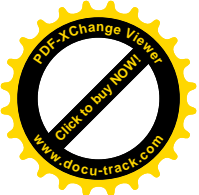
Desde esa fecha se han estado introduciendo y multiplicando los híbridos de banano y plátano desarrollados por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) que han tenido gran aceptación y demanda entre los productores y los consumidores, por la disminución en el uso de productos químicos, alto consumo como frutas frescas y cocido. Actualmente se tienen informes que el área cultivada es de 15 000 hectáreas, entre las que se destacan los bananos 'FHIA-03', 'FHIA-18' y 'FHIA-23' y en menor proporción el plátano 'FHIA-21' (FHIA, 2007). Por esta razón, diversos cultivares de musáceas son propagados usando la técnica de cultivo *in vitro* vía organogénesis directa, a través de brotes axilares.



El cultivo *in vitro* constituye la base de la propagación masiva de plátanos y bananos, con vigencia en muchos países (García *et al.*, 2002). Sin embargo, para el caso de la mayoría de los cultivares híbridos de la FHIA, las metodologías que se aplican requieren ser optimizadas. En particular, la propagación *in vitro* a escala comercial del 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) en medio de cultivo en estado semisólido ha presentado muy bajos coeficientes de multiplicación, lo que limita el número de plantas producidas *in vitro* que se pueden obtener a partir de una planta seleccionada en campo (De Feria *et al.*, 2005).

La comunidad científica ha trabajado en la solución de esta problemática y autores como Jiménez *et al.* (2002) con el objetivo de aumentar el índice de multiplicación y la calidad de las plantas *in vitro* del cv. híbrido 'FHIA-21' regeneradas por organogénesis directa evaluaron el efecto de brasinoesteroides (BIOBRAS-6). En este estudio se logró como resultado un incremento de los principales indicadores del crecimiento de las plantas. Con este mismo objetivo De Feria *et al.* (2005) realizaron un trabajo donde utilizaron la inmersión temporal en aras de mejorar los bajos coeficientes de multiplicación presentados por el cv. híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) en medio de cultivo semisólido. En el mismo lograron un incremento en el coeficiente de multiplicación al aumentar el número de brotes por planta en los sistemas de inmersión temporal. Sin embargo, estos resultados aún no satisfacen la demanda creciente de plantas del cv. 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) regeneradas por esta vía, lo que ha limitado que se extienda su cultivo por todo el país.

Este problema pudiera ser revertido con el uso de la embriogénesis somática la cual ha mostrado ser un método potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis, porque ofrece la posibilidad de obtener volúmenes de producción



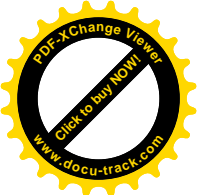
superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo (Villalobos y Torpe, 1993).

Daniels *et al.* (2002) propusieron un sistema de regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática, para la transformación genética del cultivar híbrido 'FHIA-21'. Sin embargo, esta metodología no estudia la influencia del material vegetal de origen en la capacidad de multiplicación de suspensiones celulares y germinación del embrión somático y no evalúa la respuesta de las plantas en casa de cultivo y campo.

Posteriormente, García-Águila *et al.* (2006) evaluaron la respuesta de líneas celulares embriogénicas durante la fase de multiplicación de suspensiones celulares del cultivar híbrido 'FHIA-21', así como la germinación de embriones somáticos derivados de ellas. En el año 2007 estos autores determinaron las condiciones de iluminación para la germinación de los embriones y formación de plantas completas, además evaluaron el crecimiento de las mismas en casa de cultivo. Sin embargo, estos trabajos no efectuaron la evaluación en campo de las plantas regeneradas de los embriones somáticos.

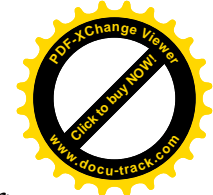
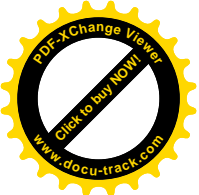
Este último aspecto es de gran importancia ya que las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* pueden mostrar variaciones que generalmente se observan a nivel de fenotipo. Este fenómeno es conocido como variación somaclonal y dicho término se introdujo por Larkin y Scowcroft en 1981. Teniendo en cuenta estos antecedentes se propone como hipótesis de trabajo la siguiente:

“Es posible mediante la evaluación morfológica, agronómica y molecular de plantas del cv. híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB), regeneradas por embriogénesis somática, determinar variaciones somaclonales que limiten su uso en la propagación a escala comercial de este cultivar”.



Los estudios que se realizan en el presente trabajo tuvieron como objetivos:

1. Determinar en casa de cultivo la presencia de cambios fenotípicos en plantas del cv. híbrido 'FHIA-21' regeneradas por embriogénesis somática.
2. Evaluar morfológica, agronómica y molecularmente las plantas regeneradas por embriogénesis somática en el primer ciclo de cultivo en campo.



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

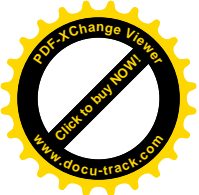
2.1. Origen del género *Musa*, descripción botánica y taxonómica.

El origen del género *Musa* es considerado en la península Malaya en Asia, como probable centro de origen primario, tanto de *Musa balbisiana* como de *Musa acuminata* cuyos cruzamientos dieron origen a todas las variedades comestibles conocidas en América (Belalcázar, 1991). Respecto a su introducción en América, el cronista Oviedo sostiene que el plátano fue llevado desde La Gran Canaria a Santo Domingo por Fray Tomás de Berlanga, obispo de Panamá en 1516, de donde se propagó a otras Islas del Caribe entre ellas Cuba y posteriormente al continente (López, 1989). Su generalización en la América Intertropical se debió a la facilidad de propagación, diversas formas de consumo y a la aptitud para producir bebidas fermentadas a partir de la pulpa madura.

Los plátanos y bananos son plantas herbáceas perennes que pueden alcanzar los 6 metros de altura (Berrie, 1997). El pseudotallo está formado por las vainas de las hojas superpuestas, un corno y un sistema radicular fibroso. Las hojas surgen en un estado de arrollamiento sumamente apretado en forma de cigarro; la inflorescencia se desarrolla de un meristemo terminal y el brote floral se forma independiente de la estación (Nalina *et al.*, 2006). Sus frutos son partenocárpicos y por lo general son geotrópicos negativos (Simmonds, 1966).

La mayoría de los plátanos son estériles pero las especies silvestres tienen frutos con semillas que se desarrollan únicamente si son polinizados de manera efectiva (Soto, 1985).

La familia *Musaceae* pertenece al orden *Zingiberales*. Dentro de la misma existen dos géneros: *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* se divide en cuatro secciones: *Australimusa*,



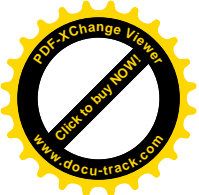
Callimusa, *Rhadochlamys* y *Eumusa*. Esta última sección comprende a las especies *M. acuminata* y *M. balbisiana*. Las musáceas comestibles se dividen en dos tipos: bananos y plátanos.

El número básico de cromosomas en el género *Musa* (Sección *Eumusa*) fue determinado en la década de los treinta y los cuarenta del siglo XX (Sandoval y Escoute, 1996). Los resultados de estos estudios indicaron que el número básico es de 11 y que existen tres niveles principales de ploidía natural en el género $2n=2x=22$, $2n=3x=33$ y $2n=4x=44$.

La mayoría de los bananos cultivados son principalmente triploides ($2n=3x=33$) y exhiben un marcado grado de esterilidad. Sin embargo, los diploides y tetraploides son también cultivados, aunque con menor frecuencia (Vuylsteke *et al.*, 1998). En algunas regiones las mutaciones somáticas acumuladas permitieron una gran diversidad fenotípica en grupos relativamente homogéneos de cultivares.

2.2. Importancia del género *Musa* y situación en Cuba.

Como alimento, el plátano es nutricionalmente similar a la papa, es fácil de digerir, es ampliamente usado en la nutrición de los infantes, muestra un efecto suavizante en el tratamiento de úlceras gástricas y diarrea. Es considerado una buena fuente de vitaminas A, B₁, B₂ y C, por el alto contenido de vitamina B₆ ayuda a aliviar el estrés y la ansiedad. Además, son utilizados para brindar sombra a grupos de cultivos, incluyendo el cacao y el café (*MusaDoc*, 2000). En el mercado internacional, las principales frutas que conforman el movimiento diario son los bananos y los plátanos. En términos de volumen, representan las primeras frutas de exportación, y ocupan el segundo lugar, después de las cítricas en términos de valor; y se corresponde a 12% del volumen total de frutas producidas en el mundo (Espinal *et al.*, 2006; FAO 2006).



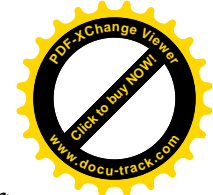
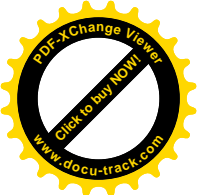
En Cuba, es elevado el consumo de plátano y banano por sus habitantes debido a que es parte esencial en su dieta alimenticia. Con la introducción de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en la década del 90, del siglo XX, se afectó severamente la producción local de los plátanos de tipo vianda (AAB), reduciéndose considerablemente la producción de las grandes empresas. Esto trajo como consecuencia la búsqueda de clones resistentes a la enfermedad y de técnicas de cultivo *in vitro* para aumentar rápidamente las áreas productivas.

A partir de 1988 se inicia una nueva fase de desarrollo en el cultivo de plátanos y bananos, con el empleo de plantas propagadas *in vitro*, las cuales reemplazaron los clones comerciales existentes por los procedentes de la FHIA (Pérez y Orellana, 1994). Dentro de los cuales, se encuentran los híbridos de bananos 'FHIA-03', 'FHIA-18' y 'FHIA-23' y en menor proporción el plátano 'FHIA-21' (FHIA, 2007). Esta baja proporción en la producción del cv, híbrido de plátano 'FHIA-21' se debe principalmente a las limitantes que presenta en la propagación *in vitro* de brotes axilares, dado por el bajo coeficiente de multiplicación (García *et al.*, 2002). La misión actual del país se dirige al aumento de la producción de este cv. para contribuir a la satisfacción de la demanda creciente de la población.

2.3. Caracterización del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB).

La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) durante las últimas décadas ha trabajado en el mejoramiento genético del género *Musa*. Uno de los cultivares híbridos desarrollado por esta fundación es el 'FHIA-21', el cual presenta las siguientes características (FHIA, 2002):

- Nombre de la variedad: FHIA-21.



- Origen: FHIA, Honduras, Centro América.
- Nombre del mejorador: Phillip Rowe.
- Tipo: Plátano tipo Francés.
- Año de generación: 1987.
- Nombre código: FHIA SH-3460.
- Linaje: AVP-67 (AAB) X SH-3142 (AA).
- Genoma/Ploidía: AAAB.
- Uso: Consumo procesado (hervido o frito, verde o maduro).

Características de la planta:

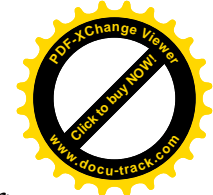
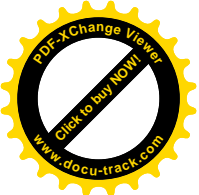
Morfológicas:

- Hábito foliar: Decumbente.
- Apariencia del seudotallo: Brillante (no ceroso).
- Altura: 3,5 – 4,0m.
- Tipo de bellota: Normal (presente permanentemente).
- Forma de racimo: Asimétrico.
- Posición del racimo: Ligeramente inclinado.
- Color del fruto: Verde claro.
- Forma del fruto: Recto en la parte distal.
- Forma del ápice del fruto: Ligeramente puntiagudo.

Fenológicas:

- Duración primer ciclo vegetativo (siembra a floración): 240 – 280 días.
- Duración primer ciclo productivo (parición a cosecha): 85 – 100 días.
- Días transcurridos de siembra a segunda floración: 540 – 570 días.

Producción:



- Peso neto del racimo (sin raquis): 22 – 27kg.
- Número de dedos por racimo (sin desmane): 120 -150 dedos.
- Número de dedos/racimo (con desmane a 5 manos): 70 – 80 dedos.
- Peso dedos individuales (con desmane a 5 manos): 250 – 350g.

Respuesta a enfermedades:

- Sigatoka negra: Parcialmente resistente.
- Mal de Panamá: Resistente.
- Nemátodos: Susceptible a *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffea*.
- Pudrición de corona: Desconocida.

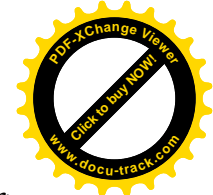
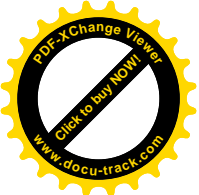
Descripción del sitio de evaluación:

- Localización: Latitud N 15° 2131 Longitud O 87° 5635.
- Precipitación Pluvial Anual: 1000 a 1200mm³.
- Temperatura Promedio Anual: 26°C.
- Altura Promedio: 25msnm (metros sobre el nivel del mar).

Álvarez y Rosales (2004) determinaron los principales caracteres morfológicos para la identificación de los cultivares híbridos de bananos y plátanos de la FHIA en Cuba. Entre los más distintivos encontraron la coloración del pseudotallo, disposiciones de las hojas y el tipo y color del canal peciolar.

2.4. Generalidades de la propagación *in vitro* del género *Musa*.

Para la manifestación de la totipotencia celular en los cultivos vegetales *in vitro* existen dos vías, la organogénesis y la embriogénesis somática. La regeneración por una u otra vía depende también de las características genéticas de las plantas y del manejo del



cultivo *in vitro*, desde los medios de cultivo hasta las condiciones ambientales para el desarrollo de las plantas, tejidos o células (Gómez, 1998).

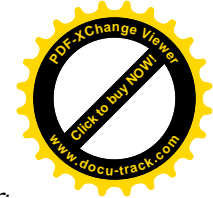
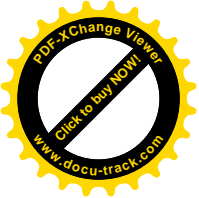
2.4.1. Organogénesis.

La organogénesis directa constituye la base de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de brotes axilares y la formación de brotes adventicios (Jiménez, 1998).

En bananos y plátanos la técnica de cultivo de brotes axilares es el método más utilizado para la propagación comercial (Israelí *et al.*, 1995). A pesar de esto no es la técnica más rápida y eficiente; sus desventajas radican en la laboriosidad del proceso, altos costos, bajos coeficientes de multiplicación y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo, no obstante, existen posibilidades de automatizar algunas fases del proceso con la utilización de biorreactores (Takayama y Akita, 1996) y sistemas de inmersión temporal de los explantes (Jiménez *et al.*, 1998).

La propagación *in vitro* del cv. híbrido 'FHIA-21' a través del cultivo de brotes axilares presenta aspectos negativos que afectan su tasa de multiplicación; como brotes deformados con crecimiento en rosetas (García *et al.*, 2002).

Jiménez-Terry *et al.* (2002) con el objetivo de incrementar la tasa de multiplicación y calidad de las plantas evaluaron el efecto del brasinoesteroide (BIOBRAS-6) en la micropropagación de este cultivar. Posteriormente, De Fera *et al.* (2005) evaluaron la multiplicación de los brotes axilares en medio de cultivo líquido en sistemas de inmersión temporal (SIT). Aunque los resultados demostraron un incremento en el número de los



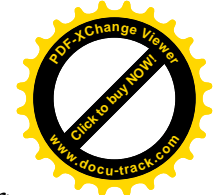
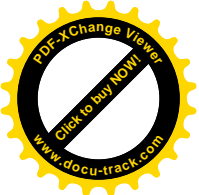
brotos por planta, la tasa de multiplicación no permite aún la propagación eficiente de este cultivar.

2.4.2. Embriogénesis somática.

Las plantas son únicas en su habilidad de producir embriones somáticos (Jayasankar *et al.*, 2001). Von Arnold *et al.* (2002) definieron la embriogénesis somática como un proceso en el cual la estructura bipolar semejante a un embrión cigótico se desarrolla de una célula no cigótica sin conexión vascular con el tejido original. La mayoría de los embriones somáticos pasan por las mismas etapas de desarrollo de un embrión cigótico (Choi *et al.*, 1999; Tajavathi *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002^a; Ramos *et al.*, 2003; Sobri *et al.*, 2006). Aunque estructural y fisiológicamente son similares a los embriones cigóticos, los embriones somáticos están carentes de la cáscara protectora de la semilla y tejidos accesorios nutricionales (Jayasankar *et al.*, 2001).

Los embriones somáticos pueden ser obtenidos vía embriogénesis somática directa o indirecta. En la embriogénesis directa, los embriones se originan directamente de tejidos (Aly *et al.*, 2002) mientras que la indirecta incluye la proliferación del callo y los tejidos embriogénicos preceden al desarrollo del embrión (Fehér *et al.*, 2003).

La embriogénesis somática tiene ventajas poderosas para la propagación masiva; debido al alto coeficiente de multiplicación de los embriones somáticos, facilidad de usar un medio de cultivo líquido, manejo de elevado número de embriones a la vez y el posible uso de biorreactores (Hamidah *et al.* 1997). La embriogénesis somática ha mostrado ser un método de mayor eficiencia en lo referido al incremento de los coeficientes de multiplicación respecto a la organogénesis (Yantcheva *et al.*, 1998). Además, provee un sistema ideal *in vitro* para estudios básicos de la biología celular de la planta y desarrollo



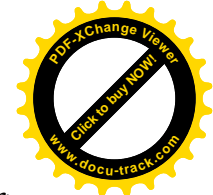
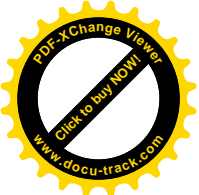
del embrión (Find *et al.*, 1998), proporciona un proceso experimental ideal para investigar la diferenciación y para entender los mecanismos de expresión de la totipotencia celular de la planta (Arya *et al.*, 2000). Sin embargo, la inducción del embrión somático y la regeneración de plantas todavía no son procesos eficientes para muchas especies.

El conocimiento técnico para la obtención de un ilimitado número de embriones somáticos con tamaño y forma uniformes y que den lugar a plantas estables genéticamente todavía no se ha alcanzado en muchas de las especies en las que se ha informado de la aplicación de este método (Gómez, 1998).

En 'FHIA-21', Daniels *et al.* (2002) propusieron un sistema de regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática como base para la transformación genética. Posteriormente, García-Águila *et al.* (2006) evaluaron la respuesta de líneas celulares embriogénicas de este cultivar durante la fase de multiplicación de suspensiones celulares, así como la germinación de embriones somáticos derivados de ellas. Estos mismos autores en el año 2007 determinaron las condiciones de iluminación para la germinación de los embriones y formación de plantas completas, además evaluaron el crecimiento de las mismas en casa de cultivo. Sin embargo, estos trabajos no efectuaron la evaluación en campo de las plantas regeneradas de los embriones somáticos.

2.4.3. Variación somaclonal.

Según Larkin y Scowcroft (1981), puede existir una variabilidad genética que surge como consecuencia de la dediferenciación celular que ocurre durante el cultivo *in vitro*. Este fenómeno llamado "variación somaclonal", se define como la variación fenotípica y genética entre plantas propagadas clonalmente a partir de un clon donador simple (Kaeppeler *et al.*, 2000).

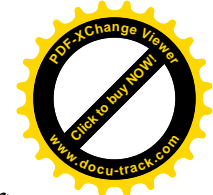
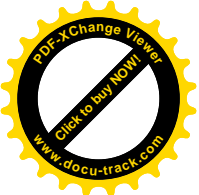


Brar y Jain (1998) refieren, que la variación somaclonal ha sido descrita para un gran número de especies de plantas tales como: papa, caña de azúcar, tabaco, tomate, arroz, trigo, col, plátanos, bananos entre otras. Señalan, además, que ha sido muy debatido si la variación somaclonal es el resultado de diferencias genéticas preexistentes en células somáticas o si es inducida por componentes específicos del medio de cultivo.

Desde 1981 hasta la actualidad el origen exacto del mecanismo de la variación somaclonal aún no se ha esclarecido. Las causas probables incluyen cambios en el cariotipo (número y estructura de cromosomas), cambios crípticos asociados con rearrreglos de cromosomas, arreglos del gen somático, *crossing over* mitótico, intercambio de cromátidas hermanas, amplificación, deleción y metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), elementos transponibles, factores citoplasmático, mutación puntual y por un mecanismo de respuesta al estrés (Chalyk, 2007).

La variación pudiera, además, surgir debido a cambios epigenéticos comúnmente observados en el cultivo de tejidos, los cuales no son hereditarios y sí reversibles (FAO, 2006). Las células cultivadas cuando se exponen a varios estreses (condiciones del cultivo de tejidos) pudieran resultar en una expresión alterada transitoria o modificación de características. Tales cambios son temporales, algunos de ellos pudieran deberse a metilación y amplificación del ADN o a elementos transponibles. Estos cambios también pudieran estar dados por la ruptura de procesos de control normales (Brar y Jain, 1998).

Chalyk (2007), expresa que ciertos genotipos son más susceptibles a los cambios genéticos en el cultivo de tejidos, generalmente los genotipos poliploides lo son más que los diploides.

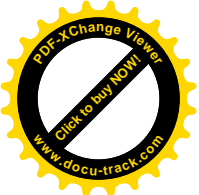


2.4.3.1. Origen de la variación en *Musa* spp.

Los experimentos para identificar el origen de las variaciones deben ser llevados a cabo en grandes grupos de plantas (Côte *et al.*, 1993). Estos autores consideran que las modificaciones en el balance hormonal endógeno son frecuentemente relacionadas con la variación somaclonal. El estudio del metabolismo de giberelinas es particularmente interesante en el caso de la detección de enanismo *in vitro* (Reuveni, 1998).

Israeli *et al.* (1991), mencionan que las diferentes variantes en *Musa* se manifiestan generalmente como cambios en el hábito de crecimiento, follaje y estructura de la inflorescencia de la planta. Estas son usualmente detectables solo en la etapa de semillero, campo o incluso en la producción de la fruta. La detección visual temprana en el laboratorio o en la etapa de endurecimiento antes de transferir las plantas a campo es posible solo en muy limitado número de casos tales como un enanismo extremo. La detección de la mayoría de las variantes se dilata en el tiempo, las mismas pueden ser observadas desde meses hasta más de un año en los procesos de cultivo *in vitro* aparentemente generador de la variación somaclonal.

Withers (1992), refiere que para identificar *in vitro* la variación somaclonal tan pronto como esta ocurra se hace necesario el uso de marcadores de etapas o fase temprana tales como: conteo, estructura y banda de cromosomas, mediciones del ADN, análisis de isoenzimas, contenido de clorofila, análisis de productos secundarios, entre otros. Algunas variantes morfológicas pudieran simplemente tener una diferente morfología *in vitro*. Por ejemplo, como se ha observado, el incremento de la ploidía es marcado por un incremento en el grueso de la hoja, el tamaño de las células epidérmicas y la densidad de los estomas (Reuveni, 1990).

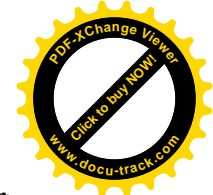
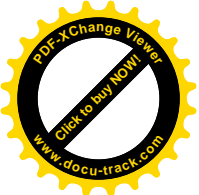


Este propio autor demuestra que algunas variantes en campo tales como plantas con hábito de hojas inclinadas pudieran estar reflejadas en el coeficiente de crecimiento *in vitro*; expresado ya sea como índices de acumulación de peso seco o de formación de primordio de la hoja. Las anomalías del índice de crecimiento podrían estar ligadas a cambios en los niveles de reguladores de crecimiento endógeno o una respuesta cambiada a reguladores del crecimiento (giberelinas) endógenos o aplicados exógenamente.

2.4.3.2. Tipos de variantes somaclonales en *Musa* spp.

Muchos estudios en *Musa* han demostrado que gran parte del material vegetal propagado *in vitro* difiere del cual él fue obtenido. Vuylsteke *et al.* (1991), Dhed'a (1992) y Grapin (1995), fueron los primeros en hacer referencia a la variación somaclonal en plantas de plátanos y bananos regeneradas a partir de suspensiones celulares (células embriogénicas en suspensión), la cual representa un obstáculo para la aceptación de las musáceas micropropagadas como fuente principal de material vegetal en las plantaciones comerciales (Smith y Hamill, 1993).

Las variaciones somaclonales más frecuentes observadas en los plátanos y bananos son cambios en: la altura de la planta, variaciones en la inflorescencia y presencia de diferentes anomalías en las hojas. Las variaciones que afectan la altura, se presentan con mayor frecuencia en el banano en un rango de 85-90% (Daniells *et al.*, 1999). La variación de la inflorescencia relacionada con la forma y tamaño de la fruta son frecuentes en los bananos tipo 'Cavendish', mientras que la variación de la morfología del racimo predomina en los cv. de plátanos. Las mismas, son clasificadas en cuatro tipos de acuerdo con el grado de degeneración de la inflorescencia: plátano "French", "French Horn", "False Horn" y "Horn" (Vuylsteke, 2001). Este autor refiere que el plátano "French"



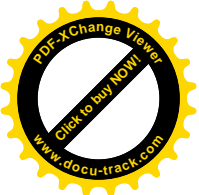
se caracteriza por tener inflorescencia con varios frutos pequeños y flores masculinas persistentes, sin embargo el plátano "French Horn", "False Horn" y "Horn" se caracteriza por tener inflorescencia con pocos frutos fuertemente partenocárpicos y brotes masculinos ausentes a la madurez.

La ocurrencia de dos tipos de variaciones en la misma planta es poco común (Israeli *et al.*, 1995).

En el caso específico del cv. 'Grande Naine' (AAA), la variabilidad ha sido bien caracterizada en investigaciones y en la producción en varios países y en todos con resultados similares. Se informa que del 75-80% del total de la variabilidad son plantas enanas, 10% son plantas más altas tipo "Valery" y afectación al limbo 10% (González, 1995). Aclarando que esta relación se ha mantenido independiente del valor total de la variabilidad.

Se han encontrado otras variantes somaclonales que incluyen hojas variegadas, láminas distorsionadas, florecimiento retardado, forma alterada del racimo y hábito de crecimiento con hojas caídas, plantas gigantes "*mosaic-like*" que es una anomalía foliar descrita por Reuveni e Israeli (1990) y se caracteriza por hojas con bordes lobulados y presencia de manchas de tamaño irregular en ambos lados de la hoja distribuidas por todo el follaje. Otra variante llamada "Grele" se caracteriza por la presencia de plantas de estatura reducida con un pseudotallo delgado; dicha variación ha sido observada por Marie (1993), Morpurgo *et al.* (1997) y Sandoval *et al.* (1997).

Autores como Israeli *et al.* (2000), encontraron que las variantes más frecuentes observadas en plantas de 'Grande Naine' (AAA) regeneradas vía embriogénesis somática fueron el enanismo y el tipo mosaico.



Otros autores como Matsumoto *et al.* (2006), después de realizar un estudio comparativo de la tasa de multiplicación *in vitro* de variantes enanas con las sin variación y observar que la proporción de variantes enanas aumentó con el número de subcultivos en los bananos micropropagados, sugieren que la alta incidencia de éstas puede ser explicada por la mayor capacidad que tienen de producir brotes.

Autores como Gómez *et al.* (2006), realizaron un estudio en campo de plantas del cultivar híbrido de banano FHIA-18 regeneradas a partir de embriones somáticos multiplicados en biorreactores, que confirma que las variaciones observadas (cambios de coloración del pseudotallo, enanismo y diferencias de pigmentación de las hojas) durante el primer ciclo del cultivo, se deben a cambios epigenéticos; permaneciendo solo las plantas con crecimiento retardado durante el segundo ciclo de la plantación.

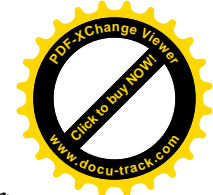
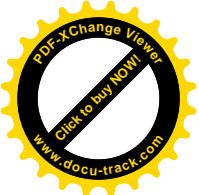
2.5. Técnicas utilizadas para evaluar la variación genética en *Musa spp.*

El monitoreo de la variación genética es importante, especialmente en los casos donde las musáceas son mantenidas y multiplicadas *in vitro*, debido a la frecuente ocurrencia de variación somaclonal (Sandoval *et al.*, 1996, Vuylsteke *et al.*, 1996).

Para poder evaluar la variación genética es preciso el uso de marcadores genéticos que identifiquen en un individuo las características del fenotipo, del genotipo o de ambos. Un marcador genético es un carácter cuantificable que puede detectar variación ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN (De Vicente y Fulton (2003).

Los marcadores genéticos se clasifican en tres grupos:

- Marcadores morfológicos.
- Marcadores bioquímicos o proteicos.
- Marcadores moleculares o de ADN.

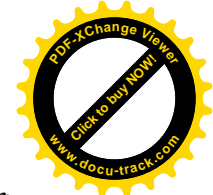
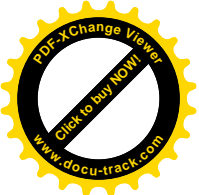


2.5.1. Marcadores morfológicos.

Tradicionalmente la caracterización e identificación de variedades en el género *Musa*, se ha cimentado en el empleo de caracteres morfológicos, los cuales se observan en casi todos los ambientes (Rallo *et al.*, 2002). Esta caracterización responde de forma general a: estudios de mejoramiento genético en la búsqueda de genotipos resistentes a plagas y enfermedades y a la mejora de caracteres agronómicos. Por ejemplo, Bermúdez *et al.* (2000) realizaron un trabajo para mejorar caracteres agronómicos a través de la selección de somaclones de porte bajo en poblaciones irradiadas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' (AAAB), con el uso de la biotecnología.

Con el objetivo de unificar criterios de evaluación la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP) dirigida y administrada por el Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), desde 1996 confeccionó Descriptores para este género que permiten el establecimiento de las relaciones entre y dentro de un grupo taxonómico, identificación de duplicados, determinación de los principales caracteres que permiten diferenciar los genotipos, evaluación sistemática del material vegetal experimental y la selección de clones de interés (Osuji *et al.*, 1997; Ortiz *et al.*, 1998).

La caracterización morfoagronómica se ha utilizado en el monitoreo de la estabilidad genética entre plantas procedentes del cultivo de tejidos, especialmente en plantas regeneradas a partir de brotes axilares (organogénesis), por ser el método de propagación *in vitro* más utilizado (Sandoval *et al.*, 1997). Sin embargo, existen pocos estudios de estabilidad genética en plantas obtenidas a partir de los embriones somáticos. Entre estos se destacan el trabajo de Côte *et al.* (2000), en una población de 500 plantas del cultivar 'Grande Naine' (*Musa* AAA) regeneradas a partir de suspensiones celulares



embriogénicas. El estudio de Gómez *et al.* (2006) en 1500 plantas del cultivar híbrido de banano 'FHIA-18' (*Musa AAAB*) procedentes de embriones somáticos multiplicados en biorreactores y germinados en sistemas de inmersión temporal. Estos autores observaron plantas con crecimiento retardado (enanas), cambios en la coloración del pseudotallo, peciolo con aletas reforzadas y cambios en e haz de la hojas.

No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos que no permiten representar verdaderas similitudes o diferencias genéticas (Rojas, 2003).

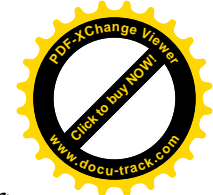
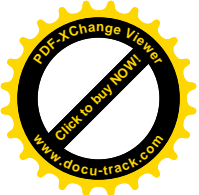
Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto; constituyendo una medida imperfecta del potencial genético de las mismas (Rodríguez y Arencibia, 2002).

En *Musa* se ha caracterizado morfológicamente en casa de cultivo plantas fuera de tipo enanas en el cv. 'Grande Naine' y 'Williams' (Israeli *et al.*, 1991). Este autor en ese mismo año detecto otros fuera de tipo como plantas variegadas y plantas de tipo mosaico en 'Grande Naine' a través de una caracterización morfológica.

2.5.2. Marcadores bioquímicos o proteicos.

Para superar las limitaciones de los marcadores morfológicos, se han desarrollado otros tipos de marcadores, tanto a nivel proteico como a nivel del ADN. Los marcadores proteicos se conocen también como 'marcadores bioquímicos' aunque se les incluye equivocadamente, y cada vez con más frecuencia, en una clase común bajo la denominación de 'marcadores moleculares' (De Vicente y Fulton (2003).

El descubrimiento de las proteínas e isoenzimas como marcadores bioquímicos ha favorecido el empleo de marcadores genéticos más eficientes que los morfológicos en



muchas ocasiones (Quirós, 1991). Estos marcadores abrieron el conocimiento de la estructura y heterogeneidad ya que por lo general permiten distinguir los genotipos homocigóticos y heterocigóticos e igualan el fenotipo con sus respectivos genotipos.

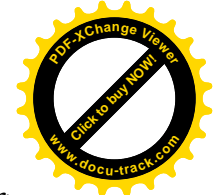
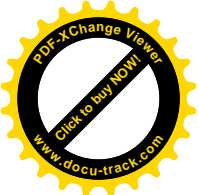
Las isoenzimas se siguen usando como punto de referencia en diferentes estudios con especies vegetales y por supuesto incluyendo *Musa*. Diversas isoenzimas entre ellas la malato deshidrogenasa y las peroxidasas se han estudiado en este género para la caracterización de clones (Mandal *et al.*, 2001).

Sin embargo, los marcadores proteicos están también limitados por la influencia del ambiente, por cambios que ocurren en las diferentes etapas del desarrollo; pueden o no reflejar los cambios genéticos que ocurren en el ADN y sólo un set de genes estructurales queda representado en estas proteínas, evaluándose sólo una parte del genoma. No obstante, son un complemento robusto del análisis morfométrico sencillo de la variación (De Vicente y Fulton (2003).

2.5.3 Marcadores moleculares o de ADN.

El problema puede ser mayoritariamente revertido con el uso de marcadores moleculares o marcadores de ADN que revelan sitios de variación de la secuencia de ADN. A diferencia de los marcadores morfológicos, las variaciones del ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden tener diferencias en un solo nucleótido del gen o en una secuencia repetitiva del ADN (Rodríguez y Arencibia, 2002).

Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos y bioquímicos, pueden ser evaluados desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis y



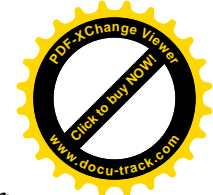
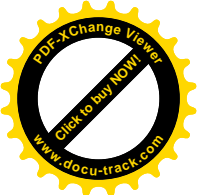
están libres de los efectos epistáticos (Tanksley, 1983; Powell *et al.*, 1996; Philips *et al.*, 1995; Rallo *et al.*, 2002).

Estos marcadores de ADN se clasifican en dos categorías según la técnica en que se basen: marcadores detectados por hibridación (emplean sondas para la detección de las variantes) y marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de "Polymerase Chain Reaction") (Rodríguez y Arencibia, 2002).

En la primera categoría se distingue la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP, por sus siglas en inglés de "DNA Restriction Fragment Polymorphisms") (Botstein *et al.*, 1980) y los marcadores utilizando secuencias de microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés de "Simple Sequence Repeats") (Bowers *et al.*, 1993).

Dentro de la segunda categoría se encuentra la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, por sus siglas en inglés de "Random Amplified Polymorphic DNA") (Williams *et al.*, 1990) y la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés de "Amplified Fragment Length Polymorphisms") (Zabeau y Vos, 1993).

En *Musa* estas técnicas moleculares se han aplicado principalmente en la evaluación de relaciones filogenéticas dentro de este género. Por ejemplo, se han utilizado técnicas moleculares como RFLP en la determinación del linaje del complejo *Musa* (Carreel *et al.*, 2002) y para investigar el origen de bananos comerciales cultivados (Raboin *et al.*, 2005). Los RFLP combinados con microsatélites se han utilizados para el análisis de la estructura poblacional del género *Musa* (Ge *et al.*, 2005).

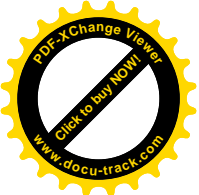


Por su parte, Lagoda *et al.* (1998), desarrollaron marcadores utilizando secuencias de microsatélites como marcaje de secuencia de microsatélite (STM, por sus siglas en inglés de “Sequence-Tagged Microsatellite”) para *Musa*, ya que consideran que la habilidad de distinguir o identificar a un individuo o grupo de individuos de otros tiene aplicaciones en diversos campos, como por ejemplo, la identificación y evaluación de bajos niveles de variación inducidos por la manipulación *in vitro*. Cabe señalar, además, que autores como Carrel *et al.* (2002), presentaron la caracterización del germoplasma de *Musa* mantenido en el banco genes de INIBAP con marcadores de microsatélites STM-PCR.

Las técnicas RFLP y RAPD se han utilizado para estimar la variación somaclonal mediante la evaluación de la variación en el número de cromosomas y su estructura (Dahleen, 1996; Damasco *et al.*, 1996).

También se ha utilizado RAPD para identificar marcadores ligados a los genomas A y B (Pillay *et al.*, 2000), en la determinación de plantas “fiel al tipo” cultivadas *in vitro* (Kahangi *et al.*, 2002) y para determinar el centro y diversidad de la especie *Musa balbisiana* (Uma *et al.*, 2006).

La técnica de AFLP fue descrita por Zabeau y Vos (1993) y adaptada para *Musa* basándose en el protocolo de Vos *et al.* (1995). Estos autores indican que se trata de una técnica poderosa, ya que combina la confiabilidad de la técnica de RFLP con el poder de la reacción en cadena de la polimerasa. La misma consiste en la amplificación de múltiples regiones arbitrarias del genoma y se basa en la amplificación arbitraria de los fragmentos de restricción del ADN ligados a adaptadores; utiliza cebadores semiespecíficos con secuencia complementaria al adaptador en el extremo 5'. Además, comprende cuatro etapas: digestión del ADN con dos enzimas de restricción, una de corte raro (reconoce secuencias de 6 pb) y otra de corte frecuente (reconoce secuencias de 4

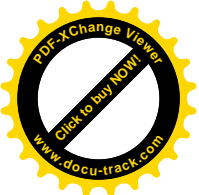


pb); acoplamiento de adaptadores específicos de doble cadena a los extremos de los fragmentos de restricción; amplificación selectiva de fragmentos con cebadores específicos, y separación de los fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para revelar el patrón de bandas, se emplean isótopos radiactivos, fragmentos biotinilados y la tinción con nitrato de plata.

Engelborghs *et al.* (1999) fueron los primeros en informar la conveniencia de utilizar AFLP en *Musa* para la evaluación de la variación genética comparando germoplasma y variantes somaclonales estrechamente relacionadas. Estos autores probaron el potencial que esta técnica tiene para la caracterización de las accesiones muy parecidas y la detección temprana de variantes enanas en el cv. 'Curare Enano'. También la técnica de AFLP ha sido utilizada para evaluar la diversidad genética en otras musáceas (Wong *et al.*, 2001; Tugume *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007).

Recientemente, Hernández *et al.* (2007), realizaron un estudio de caracterización molecular y morfoagronómico de tres variantes de plátano del clon 'CEMSA ¾' (*Musa* AAB), utilizando como marcador genético AFLP.

Por tanto, la técnica de AFLP puede ser una herramienta confiable para la caracterización molecular de las plantas regeneradas de embriones somáticos del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), Santa Clara. Las evaluaciones en campo se llevaron a cabo en la finca “La Victoria” ubicada en la Provincia Granma, durante el período comprendido entre enero de 2006 y diciembre de 2007.

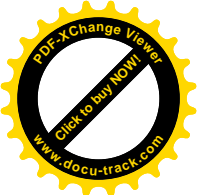
Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron embriones germinados del cv. ‘FHIA-21’ obtenidos por embriogénesis somática, la cual se inició a partir de callos con estructuras embriogénicas derivados de flores masculinas inmaduras según el protocolo descrito por Escalant *et al.* (1994) modificado por Daniels *et al.* (2002) para este cultivar. Cada callo se designó como una línea celular, a partir de los cuales se establecieron y multiplicaron suspensiones celulares embriogénicas (SCE).

Los embriones somáticos germinados (plantas) correspondientes a las líneas celulares 4 y 18 fueron obtenidos a partir de suspensiones celulares embriogénicas de 8 y 6 meses de cultivo, respectivamente.

Procesamiento estadístico

En todos los experimentos evaluados se realizaron las comprobaciones de los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos experimentales obtenidos. Para el procesamiento estadístico de los datos experimentales, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. En los casos que los datos no cumplieron los requerimientos de los supuestos mencionados se aplicaron análisis no paramétricos. En cada experimento se detallan las pruebas realizadas.



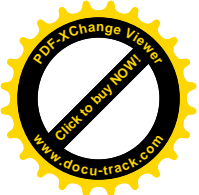
El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda de el paquete computacional SPSS versión 15.0, para ambiente del sistema operativo Windows de Microsoft®.

3.1. Evaluación en casa de cultivo de cambios fenotípicos y supervivencia de plantas regeneradas por embriogénesis somática.

El presente experimento se desarrolló con el objetivo de evaluar en casa de cultivo la supervivencia y posibles cambios fenotípicos de las plantas regeneradas de embriones somáticos procedentes de las líneas celulares 4 y 18.

Para ello, se transfirieron al ambiente *ex vitro*, una población de 6 332 embriones somáticos germinados procedentes de dos líneas celulares embriogénicas (4 y 18) y como control se emplearon 2 030 plantas por organogénesis a partir de la multiplicación de brotes axilares que se obtuvieron a través de la metodología descrita en el Instructivo técnico para la micropropagación de plátanos y bananos (IBP, 2005).

La plantación en casa de cultivo se efectuó según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999). Se utilizaron contenedores de polieturano de 70 alvéolos con una capacidad individual de 120cm². Como sustrato se empleó una mezcla de materia orgánica (80%) y zeolita (20%). La fertilización se efectuó con fórmula completa 8-13-21 a razón de 2,5cm³, con una frecuencia de dos fertilizaciones por semana. El riego se realizó por microaspersión con aspersores de baja presión (2 bar y un caudal de 122 L/h) con una frecuencia de tres riegos al día (8:00am, 12:00m y 4:00pm) y una duración aproximada de dos minutos. Con esta frecuencia de riegos se garantizó una humedad relativa en el



interior de la casa de cultivo de 80-90%. La intensidad luminosa se controló mediante una malla sombreadora plástica de color negro, que permite el paso del 70% de la luz solar.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Las evaluaciones se realizaron al 100% de las poblaciones en estudio.

A los 21 días de plantación se evaluó la supervivencia en todas las plantas y a los 45 días la presencia de plantas con cambios fenotípicos según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997) para el género *Musa*.

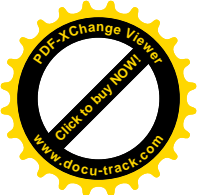
Transcurridos 45 días en casa de cultivo las plantas fueron transferidas a campo. Las mismas presentaron los parámetros morfológicos establecidos en el Instructivo Técnico del IBP (2005) para las plantas obtenidas por organogénesis.

Para la variable supervivencia la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Dunnett's C con un nivel de significación de 0,05.

3.2. Evaluación en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA 21'.

Para esto se trasladaron a campo 6 255 plantas procedentes de las líneas 4 y 18 regeneradas de embriones somáticos y como control se utilizaron 2 000 plantas obtenidas de brotes axilares y 2 000 de semilla asexual.

La plantación se realizó en la finca 'La Victoria' en suelo aluvial poco diferenciado. El experimento abarcó un área 3 hectáreas, con una distancia de plantación de 3 x 2 x 1,20m para una densidad de plantación de 3 333 plantas por hectárea, según el sistema de plantación extradenso. La temperatura promedio anual durante todo el ciclo de cultivo fue de 25±3°C. Las atenciones culturales y el riego se realizaron siguiendo el Instructivo



Técnico del Cultivo del Plátano (INIVIT, 2007). Se utilizó un diseño experimental Cuadro Latino con cuatro repeticiones.

La evaluación en campo de las plantas se realizó a través de caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares (AFLP), con el objetivo de determinar si la embriogénesis somática ocasiona variaciones en las plantas que limiten su empleo en la propagación comercial de este cultivar.

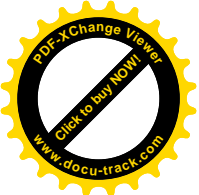
3.2.1. Evaluación en campo de caracteres morfológicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.

Con el objetivo de detectar en campo variación somaclonal en las plantas procedente de embriogénesis somática, organogénesis y semilla asexual se evaluaron diferentes caracteres morfológicos a los seis, diez y catorce meses de cultivo.

Las evaluaciones se realizaron en el 100% de las plantas madres. Para ello, se tuvieron en cuenta los criterios del Descriptor de la FHIA para el cv. híbrido 'FHIA-21' (FHIA, 2002).

Características morfológicas:

- Hábito foliar
- Apariencia del pseudotallo
- Tipo de bellota
- Forma del racimo
- Posición de racimo
- Color del fruto
- Forma del fruto
- Forma del ápice del fruto



Además, a los diez meses de cultivo se evaluaron los siguientes variables:

- Altura de la planta (m), medida desde la base hasta la inserción en forma de V de las últimas hojas emitidas.
- Diámetro del pseudotallo (cm), medido a un 1m de la base
- Número de hojas funcionales.

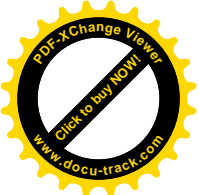
Los datos experimentales correspondientes a las variables altura de la planta, diámetro del pseudotallo y número de hojas se les aplicaron un análisis de clasificación simple. El procesamiento estadístico se realizó por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significación de 0,05.

3.2.2. Evaluación en campo de caracteres agronómicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar las características agronómicas de las plantas regeneradas por embriogénesis somática respecto a las plantas obtenidas de brotes axilares y semilla sexual.

A los 14 meses se seleccionaron 250 plantas aleatoriamente por cada tipo de sistema de propagación estudiado. Las variables evaluadas se describen a continuación:

- Número de hojas funcionales a la cosecha.
- Peso neto del racimo con desmane (kg)
- Número de manos por racimo
- Número de frutos por mano



A los datos experimentales obtenidos se les aplicó un análisis de varianza de clasificación simple. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación de 0,05.

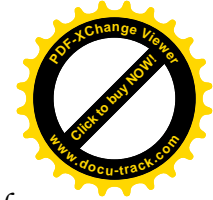
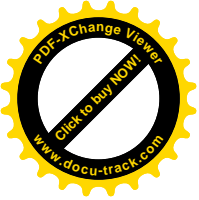
3.2.3. Caracterización molecular mediante AFLP de las plantas regeneradas por embriogénesis somática.

Este experimento se realizó con el objetivo de realizar una caracterización molecular de las poblaciones de plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de las líneas celulares embriogénicas, en plantas de brotes axilares y plantas de semilla asexual.

A las poblaciones en estudio se les realizó una caracterización molecular mediante la técnica de Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP). Para ello, se usaron las siguientes combinaciones de cebadores E-AGG / T-AGT, E-ACA / T-ATG, E-AAT / T-ACA, resultantes de una amplia búsqueda bibliográfica sobre estudios relacionados con el género *Musa*.

Las muestras colectadas constituyeron el 2,0% de cada población. Se utilizaron segmentos de hojas jóvenes (hoja cigarro) de plantas adultas a los diez meses de plantación, las muestras se colectaron en el campo. Los segmentos colectados fueron tomados tanto de plantas con y sin cambios fenotípicos y de las tres poblaciones en estudio. Los mismos se colocaron dentro de un recipiente con nitrógeno líquido para su posterior traslado al laboratorio. Ya en este se sacaron del nitrógeno y se conservaron a -80°C en una congeladora hasta iniciar el proceso de extracción del ADN.

Extracción de ácido desoxiribonucleico (ADN) genómico.

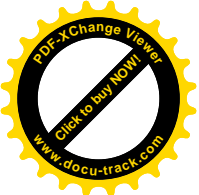


Para la extracción del ADN genómico se empleó el sistema comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Alemania). Se determinó la concentración y pureza del ADN total por el método de espectrofotometría con el empleo de un biofotómetro (Eppendorf, Alemania) y se igualaron las concentraciones de todas las muestras a 100 ng/μL.

Reacción de AFLP

El procedimiento para la obtención de los marcadores tipo AFLP se llevo a cabo según el protocolo descrito por Vos *et al.* (1995) adaptado para *Musa*.

Para la doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* (5' G´AATTC 3') (Promega, USA) y *Tru9I* (5' T´TAA 3') (Promega, USA) se utilizó 1μL del ADN genómico y se usó el tampón C (Promega, USA) en un volumen final de 50μL. La primera digestión con la enzima *EcoRI* (Promega, USA) se efectuó a 37°C por un período de tres horas y la segunda digestión con la enzima *Tru9I* (Promega, USA) a 65°C por una hora. Los fragmentos obtenidos fueron ligados con los adaptadores correspondientes a cada corte (tabla 1) usando la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas Life Sciences, Alemania) a 16°C durante toda la noche. Para la primera amplificación por PCR se usaron 5μL de la primera reacción de la ligazón y se usó la adenina (A) una base selectiva en el extremo 3' de los cebadores (tabla 1). Las condiciones usadas fueron las siguientes: 94°C por 5min, 25 ciclos a 94°C por 30s, 56°C por 1min y 72°C por 1min, y una extensión final a 72°C por 5min). Para la segunda amplificación se usaron los siguientes parámetros de PCR 94°C por 5min, 12 ciclos a 94°C por 30s, 65°C por 30s (disminuyendo 0,7°C luego de cada ciclo) y 72°C por 1min, y luego 29 ciclos a 94°C por 30s, 56°C por 30s y 72°C por 1min más una extensión final a 72°C por 5min. Para esta amplificación se tomaron 5μL de una dilución 1/20 del resultado de la primera amplificación, en esta ocasión en el extremo 3' de



los cebadores se usaron dos bases selectivas. Finalmente, se separaron los fragmentos de ADN por electroforesis vertical en gel desnaturalizante (41,3% de Urea) de poliacrilamida al 6,5%, usando una cámara de secuenciación *Sequi-Gen GT System* (Bio-Rad, USA). Las condiciones de la corrida fueron fijadas en 80W de potencia y 50°C, los demás parámetros se mantuvieron variables en el tiempo (intensidad de la corriente eléctrica (A) y potencial eléctrico (V)). Los fragmentos de ADN generados se visualizaron por tinción con plata mediante el uso del sistema comercial *Silver sequence™ DNA sequencing System* (Promega, USA).

Tabla 1. Adaptadores y oligonucleotidos usados en la reacción de preamplificación y amplificación de los AFLPs.

EcoRI

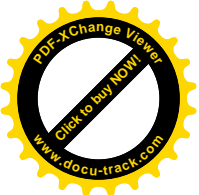
Adaptador	5´ -CTCGTAGACTGCGTACC- 3´ 3´ -CATCTGACGCATGGTTAA- 5´
Cebador de preamplificación	5´ -GACTGCGTACCAATTCa- 3´
Cebador de amplificación	5´ -GACTGCGTACCAATTCaNN- 3´

Tru9I

Adaptador	5´ -GACGATGAGTCCTGAG- 3´ 3´ -TACTCAGGACTCAT- 5´
Cebador de preamplificación	5´ -GATGAGTCCTGAGTAAa- 3´
Cebador de amplificación	5´ -GATGAGTCCTGAGTAaNN- 3´

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados se usaron matrices binarias para codificar la presencia o ausencia de caracteres polimórficos; se considera con el valor 1 la presencia y con el valor 0 la ausencia de las bandas con igual migración electroforética. Los datos fueron procesados con el programa *Dollo and Polymorphism Parsimony* (Dollop) que pertenece al paquete de análisis Filogenético PHYLIP 3.66 (Felsenstein, 1993). Además



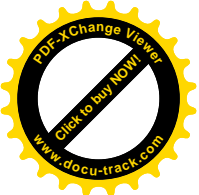
se realizó la estimación de la significación estadística del análisis por AFLP, la cual se describe a continuación.

Estimación de la significación estadística de la distancia filogenética.

Este estudio se realizó con el objetivo de estimar la significación estadística de la distancia filogenética obtenida para el material vegetal en estudio mediante el análisis por AFLP. Para ello en primer lugar, se obtuvo una fracción del genoma de *Musa acuminata*. Las secuencias nucleotídicas se derivaron de una biblioteca obtenida mediante la tecnología de cromosoma artificial bacteriano (BAC, por sus siglas en inglés de “Bacterial Artificial Chromosome”) disponibles en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los números de acceso correspondientes son DX453562-DX458350.

Los datos obtenidos consisten en 6 252 clones que cubren 4 420 944 pb (Cheung, F. *et al.*, 2007). Estos fueron almacenados localmente para su posterior procesamiento. Mediante un *script* del lenguaje de programación PERL, implementando un algoritmo de conteo de palabras, se estimó la distribución de frecuencias de aparición de los sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *Tru9* en el genoma de *Musa acuminata*.

Para cada caso de aparición de las secuencias reconocidas por estas enzimas, se obtuvo además la secuencia del triplete de bases cuesta abajo del sitio de corte. Se generaron las 64 combinaciones teóricas posibles de adaptadores formados por las secuencias correspondientes a los sitios de corte de estas enzimas y un triplete de bases. A cada una de estas secuencias se le asignó la frecuencia de aparición en el genoma de *Musa acuminata* según los datos anteriormente obtenidos.



Dichas frecuencias se transformaron en valores porcentuales respecto al número total de sitios de corte de *EcoRI* y *Tru9* encontrados en el genoma. Se determinó el potencial teórico máximo de cubrimiento de polimorfismo (PMCP) como la multiplicación de los valores porcentuales de los adaptadores que más ocurren en el genoma de *Musa acuminata* para ambas enzimas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación en casa de cultivo de cambios fenotípicos y supervivencia de plantas regeneradas por embriogénesis somática.

Como resultado se observó que las plantas regeneradas de embriones somáticos y brotes axilares mostraron una rápida adaptación a las condiciones *ex vitro* en casa de cultivo y la mayoría emitieron nuevas hojas a partir de los 10 días de plantadas (Figura 1 A).

A los 21 días el porcentaje de supervivencia de las plantas regeneradas de embriones somáticos fue de 98,8% (6 255 plantas) y de 98,6% (2 000) plantas control regeneradas por de brotes axilares (organogénesis). En la figura 1 B se observan plantas obtenidas por embriogénesis somática después de 21 días en casa de cultivo.

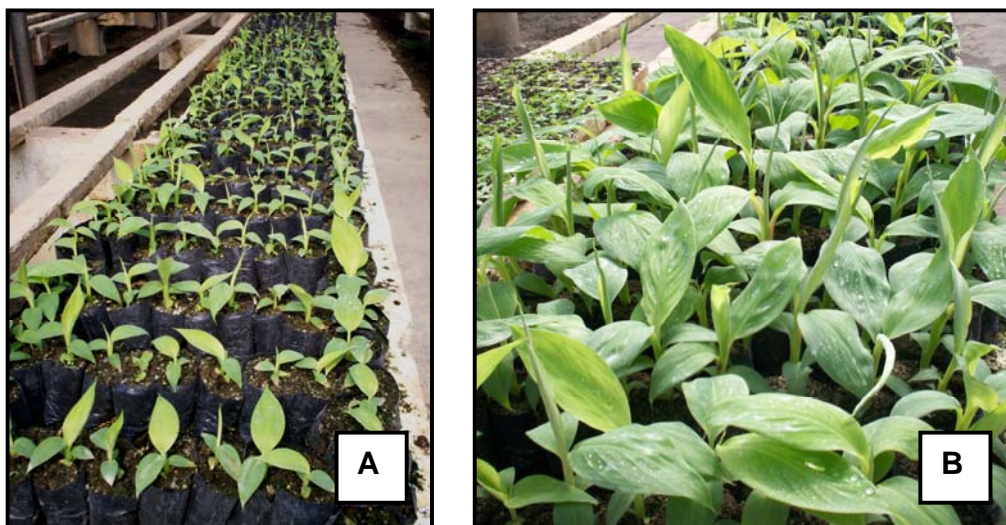
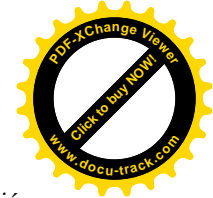
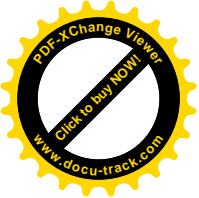


Figura 1. Plantas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' procedentes de embriones somáticos a los 10 días (A) y (B) 21 días en casa de cultivo.

A los 45 días se observaron plantas con cambios fenotípicos en las poblaciones regeneradas de embriones somáticos y en las plantas obtenidas de brotes axilares. Los cambios observados fueron plantas con hojas variegadas, plantas con hojas dobles y



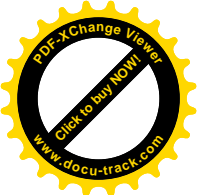
cambio en el hábito de crecimiento (Abanico). La incidencia de estos cambios en cada una de las poblaciones estudiadas se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Cambios fenotípicos en plantas regeneradas de líneas celulares embriogénicas del cv. híbrido 'FHIA 21', en casa de cultivo.

Sistema Propagación	Número de plantas	Plantas con hojas variegadas	Plantas con hojas dobles	Plantas en forma de Abanico	(%) cambios fenotípicos
Embriogénesis (L-4)	4625	3	4	3	0,22
Embriogénesis (L-18)	1630	2	--	--	0,12
Organogénesis	2000	2	2	6	0,50
Total	8 255	7	6	9	0,26

La incidencia de plantas con cambios fenotípicos en el total de la población (6255 plantas) de embriones somáticos fue menor (0,19%) respecto a las plantas obtenidas por brotes axilares, el cual fue de 0,5% del total de plantas evaluadas.

La línea celular 4 tenía un total de 4 625 plantas y de ellas 10 con cambios fenotípicos correspondientes a plantas con hojas variegadas, hojas dobles y plantas en forma de abanico, eso significa 1 planta cada 500 aproximadamente (462). Mientras que la línea celular 18 tuvo un total de 1 630 plantas y 2 con cambios (plantas con hojas variegadas) eso significa 1 planta cada 815 aproximadamente (800). Sin embargo, las plantas regeneradas de brotes axilares tenían una población total de 2 000 plantas y 10 con cambios fenotípicos correspondientes a plantas con hojas variegadas, hojas dobles y plantas en forma de abanico y eso significa 1 planta cada 200 aproximadamente. Esto evidencia que la embriogénesis somática ocasiona menor número de variantes somaclonales al menos que pueden ser detectadas en casa de cultivo.



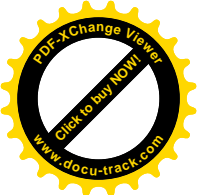
Además se observó la influencia que parece tener la edad de las suspensiones celulares en el cultivo *in vitro* relacionado con el origen de plantas fuera de tipo ya que las plantas regeneradas de las suspensiones celulares de más tiempo de cultivo (L-4, 8 meses) mayor porcentaje de cambios fenotípicos.

La supervivencia de plantas regeneradas por embriogénesis somática y la incidencia de variación somaclonal en condiciones de casa de cultivo, ha sido descrita por diferentes autores.

Shchukin *et al.* (1998), al evaluar un total de 4900 plantas regeneradas de embriones somáticos con 4111 plantas control propagadas mediante el cultivo de brotes axilares. Sus resultados demostraron que la tasa de plantas anormales producidas vía embriogénesis somática en los tres lotes (7,9%; 2,6%; 1,6%) no fue más alta que la tasa obtenida en las plantas por el cultivo de brotes axilares (10,4%, 3,6%, 2,3%).

Côte *et al.* (2000) durante la fase de aclimatización de plantas regeneradas de embriones somáticos en el cv. 'Grande Naine' (AAA), observaron hojas variegadas o deformadas (0,5-1,3%) y plantas con hojas dobles que constituyeron el 0,5-2,0% de la población y señalaron además que fueron observados en plantas obtenidas de brotes axilares.

Por su parte, López *et al.* (2005) al comparar en casa de cultivo plantas regeneradas de embriones somáticos del cv. de plátano vianda 'Navolean' (*Musa* AAB) utilizando como explante inicial meristemas de brotes axilares y multiyemas (*scalps*) obtuvieron porcentajes de supervivencia superiores al 97,0% y una variación somaclonal correspondiente a manchas irregulares de las hojas (variegadas) cuyos porcentajes fueron 0,4 y 0,5% respectivamente.

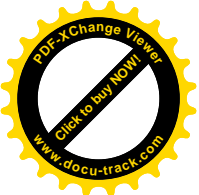


Posteriormente, Gómez *et al.* (2006), durante un estudio comparativo en casa de cultivo de plantas del cv. híbrido de banano 'FHIA-18' (AAAB), obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis confirmaron un porcentaje de supervivencia del 98,5%. A su vez, describieron un 0,4% de plantas con hojas variegadas en las plantas de embriones somáticos regeneradas en biorreactores y 0,3% en las obtenidas de brotes axilares.

Dhed'a (1992) fue el primero en informar sobre la variación somaclonal en plantas derivadas de suspensiones celulares embriogénicas. Posteriormente, Schoofs *et al.* (1999) encontraron aneuploidía en suspensiones celulares de 9 años del cv. 'Bluggoe' (*Musa* AAB), mediante citometría de flujo. Estas suspensiones presentaron baja tasa de regeneración y las plantas resultantes fueron anormales, las cuales mostraron un lento crecimiento *in vitro* y *ex vitro* en comparación con las plantas control. Estos autores comprobaron que suspensiones celulares de 4 años de cultivo del cv. 'Three Hand Planty' (*Musa* AAB) presentaron alto potencial de regeneración y niveles normales de ploidía.

La literatura científica señala que la edad de cultivo de las suspensiones celulares juega un papel fundamental en la presencia de una menor o mayor variación somaclonal (Côte *et al.* (2001). Estos autores plantearon que suspensiones celulares del cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA) con más de 10 meses de cultivo, generaron plantas con un mayor riesgo de manifestar algún tipo de variación en su morfología.

Por otra parte, Daniels *et al.* (2002), en el cv. híbrido 'FHIA-21' plantearon que la edad máxima de las suspensiones celulares para la regeneración de plantas debe ser 14 meses a partir de la cual pierden su capacidad embriogénica. Ellos infieren que esta pérdida puede indicar la presencia de variaciones somaclonales, sin embargo no comprueban sus resultados en condiciones *ex vitro*.



Se comprobó en casa de cultivo que las plantas regeneradas por embriogénesis somática mostraron características similares a las propagadas por organogénesis. Solo se observaron cambios fenotípicos en 12 plantas de 6 255 (0,19%), valor inferior al control (0,5%). Estos se localizaron en las hojas (variegadas, dobles y en abanico).

4.2. Evaluación en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA-21'.

4.2.1. Evaluación en campo de caracteres morfológicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.

Los caracteres morfológicos evaluados a las plantas regeneradas de embriones somáticos mostraron correspondencia con las plantas procedentes de organogénesis y semilla asexual.

En las plantas pertenecientes a los tres sistemas de propagación se observó hábito de foliar decumbente, apariencia del pseudotallo brillante no ceroso, bellota permanente en el racimo, racimo asimétrico y ligeramente inclinado, con frutos de color verde claro y recto en la parte discal. Estos caracteres morfológicos coinciden con el Descriptor de la FHIA (2002) para este cultivar (Figura 2).

Las plantas fuera de tipo encontradas en casa de cultivo en las poblaciones de embriones somáticos y brotes axilares recuperaron sus caracteres fenotípicos, no difiriendo de las plantas restantes. Esta respuesta puede atribuirse según Côte *et al.* (2000) a cambios epigenéticos.

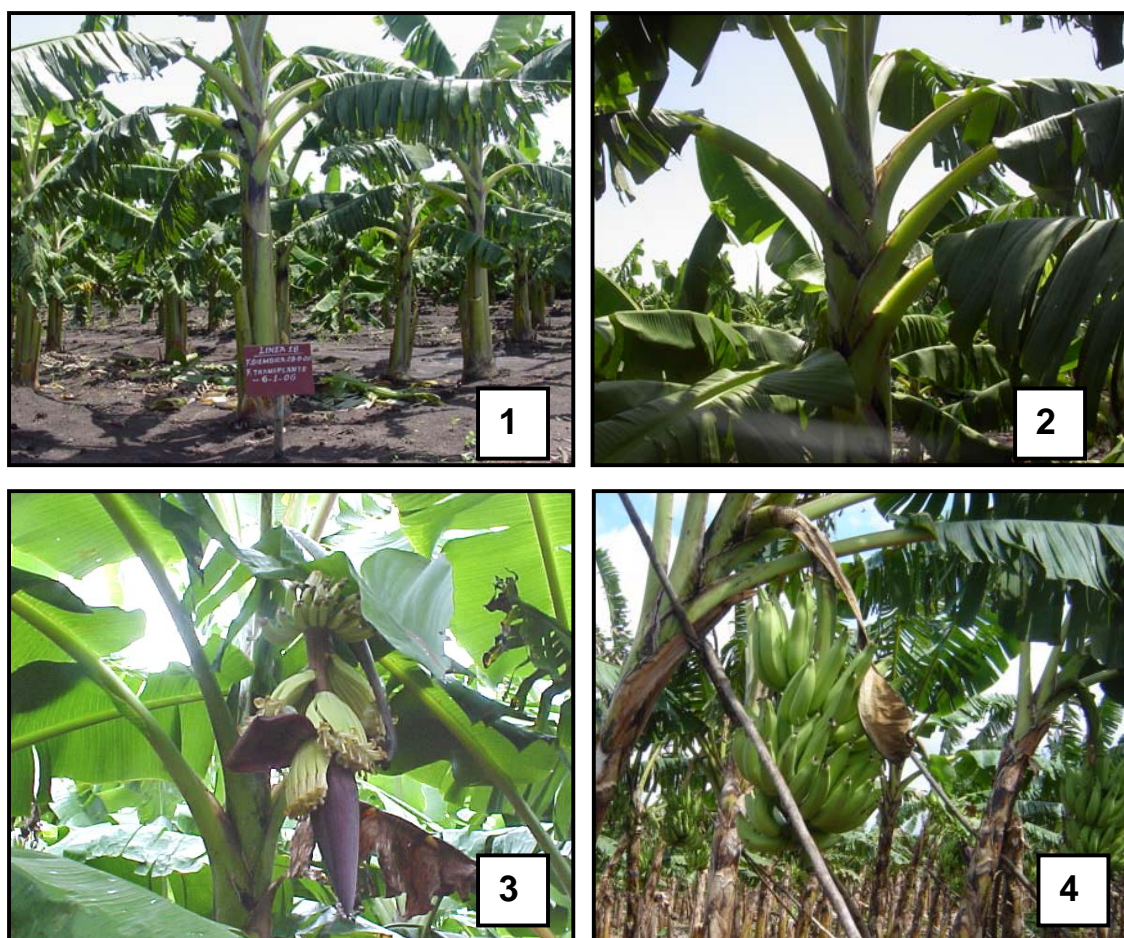


Figura 2. Plantas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' procedentes de embriones somáticos (1-4). (1) Plantas con hábito foliar decumbente a los 6 meses de la plantación. (2) Coloración del pseudotallo brillante no ceroso. (3) Tipo de bellota. (4) Forma y posición del racimo.

A los 10 meses se observó en la población correspondiente a la línea 4 una planta fuera de tipo. La misma se caracterizó por presentar menor altura y pseudotallo delgado (Figura 3). Este tipo de variante fenotípica relacionada con la altura se reconoce como planta de tipo “Grele”.

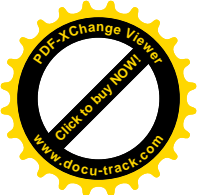


Figura 3. Planta tipo “Grele” del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' procedente de la línea celular embriogénica 4, a los 10 meses de la plantación.

García *et al.* (2002) con el objetivo de incrementar la variabilidad genética en el cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) mediante el uso combinado de radiaciones gamma (Cobalto 60) y brotes adventicios obtuvo diferentes variantes somaclonales, que incluyó una planta de tipo “Grele”. Dicha variación fue también observada por Marie (1993), Morpurgo *et al.* (1997) y Sandoval *et al.* (1997) en otros genotipos de *Musa*.

El enanismo es uno de los cambios fenotípicos más frecuentes en plantas procedentes del cultivo *in vitro*, sin embargo no se observó en las plantas regeneradas de embriones somáticos y brotes axilares del cv, híbrido 'FHIA-21'. Este cambio se ha descrito con mayor frecuencia en cultivares de banano del subgrupo 'Cavendish' (*Musa* AAA) (Côte *et al.*, 1993). Estos autores señalan que este subgrupo podría ser utilizado como modelo en la búsqueda de marcadores temprano del enanismo.

Además, el enanismo se ha observado en el cultivar híbrido de banano 'FHIA-18' (*Musa* AAAB) en plantas regeneradas por embriogénesis somática (Gómez *et al.*, 2006).

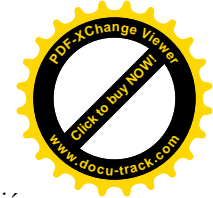
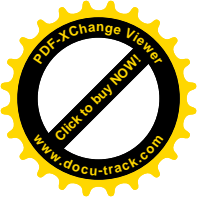


Las variaciones en la morfología del racimo son predominantes en los cultivares de plátano (Vuylsteke *et al.*, 2001), pero este cambio no fue observado en las plantas regeneradas de embriones somáticos y brotes axilares del cv, híbrido 'FHIA-21'. Sin embargo, López *et al.* (2005), en un estudio realizado en campo en plantas regeneradas de embriones somáticos del cv. de plátano 'Navoleam', observó cambios en la morfología del racimo correspondiente a la regresión a tipo "French".

Los resultados en campo mostraron un porcentaje de variación somaclonal de 0,02% en las plantas regeneradas de embriones somáticos del cv híbrido 'FHIA-21'. Este porcentaje es bajo cuando se compara con los resultados descritos por otros autores en otros genotipos.

Por ejemplo, Grapin (1995) señala de 16,0 a 22,1% de variantes somaclonales entre las plantas regeneradas a partir de una suspensión derivada de flores masculinas en el cv. 'French Sombre' (*Musa* AAB), mientras que todas las plantas obtenidas mediante una propagación clonal clásica *in vitro* fueron normales. Por otra parte, Shchukin *et al.* (1998) en el cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA) observaron valores entre 1,6-7,9% de variaciones somaclonales en plantas regeneradas de embriones somáticos, siendo el enanismo y el *mosaic-like* las variaciones más frecuentes.

Autores como López *et al.* (2005), detectaron 1,1 y 8,6% de variantes somaclonales del cv. de plátano 'Navolean', en poblaciones de plantas regeneradas de embriones somáticos utilizando como explante inicial botes axilares y multiyemas, respectivamente. Posteriormente, Gómez *et al.* (2006) anunciaron 1,0% de variación somaclonal en 1000 plantas del cv. híbrido de banano 'FHIA-18' (AAAB) regeneradas a partir de embriones somáticos en el primer ciclo de plantación.



Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, el tipo y frecuencia de la variación somaclonal que se obtuvo pudo depender del genotipo, de la elección del material vegetal de inicio y del grado de diferenciación de los tejidos, así como de los factores de estrés presentes en el cultivo de tejido dados por la composición del medio de cultivo y el tiempo de permanencia *in vitro* (Côte *et al.*, 1992). Además, existen evidencias que las condiciones *in vitro* son causas de inestabilidad mitótica (Shepherd y dos Santos, 1996) y que la metilación del ADN también puede causar alguna variación somaclonal (James *et al.*, 2004).

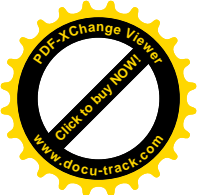
Las evaluaciones de las plantas regeneradas por embriogénesis somáticas respecto a las variables morfológicas altura, diámetro del pseudotallo y número de hojas funcionales se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Variables morfológicas en plantas regeneradas de líneas celulares embriogénicas, organogénesis y semilla asexual del cultivar híbrido 'FHIA-21', a los 10 meses de cultivo en campo.

Sistema Propagación	Altura (m)		Diámetro del pseudotallo (cm)		Número de hojas funcionales	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Embriogénesis (L-4)	2,47	17,18 c	30,28	49,53	8,50	34,57 b
Embriogénesis (L-18)	2,56	28,40 b	35,20	50,19	9,00	38,58 a
Organogénesis	2,46	17,00 c	30,10	49,23	8,42	33,67 b
Semilla Asexual	2,70	45,93 a	26,03	46,85	7,60	18,25 c

Rangos medios con letras distintas en una columna difieren estadísticamente según Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$.

Las plantas procedentes del cultivo *in vitro* presentaron menor altura y mayor número de hojas funcionales que las plantas obtenidas de semilla asexual, con diferencias



significativas. Sin embargo, para la variable diámetro del pseudotallo no hubo diferencias significativas entre las plantas correspondientes a los tres sistemas de propagación (Tabla 3).

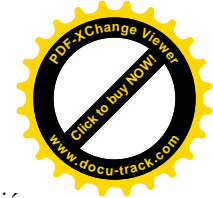
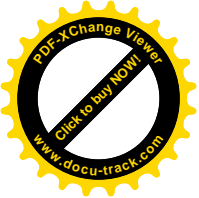


Figura 3. Plantas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' procedentes de embriones somáticos a los 10 meses de plantadas en el campo.

Los resultados en este estudio evidencian la influencia de la edad de la línea celular en el crecimiento y desarrollo de las plantas procedente de embriones somáticos en el cv. híbrido 'FHIA-21'. La línea celular 18 presentó mayor altura de la planta y número de hojas funcionales que la líneas celular 4.

Los resultados obtenidos durante la evaluación de los caracteres morfológicos muestran que la propagación de plantas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA-21' genera bajos porcentajes de variación somaclonal. En este trabajo de 6 255 plantas se observó una planta con cambio morfológico de tipo "Grele".

4.2.2. Evaluación en campo de caracteres agronómicos en plantas regeneradas por embriogénesis somática.



Las evaluaciones de las variables agronómicas peso del racimo, número de manos y frutos de las plantas regeneradas por embriogénesis somática a los 14 meses de plantación, se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Variables agronómicas en plantas regeneradas por embriogénesis somática, organogénesis y semilla tradicional del cultivar híbrido 'FHIA-21', a los 14 meses de cultivo.

Sistema de Propagación	Peso del racimo (kg.)		Nº de manos/racimo		Nº de frutos/mano		Nº hojas funcionales a la cosecha	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Embriogénesis (L-4)	39,54	24,32 a	6,35	26,25 a	78,14	22,39 b	5,64	17, 82 b
Embriogénesis (L-18)	45,86	29,23 a	6,53	29,50 a	93,86	33,13 a	7,06	29,33 a
Organogénesis	39,60	25,35 a	6,25	26,10 a	77,99	22,00 b	5,48	17,75 b
Semilla asexual	33,02	11,93 b	5,21	21,71 b	64,07	9,68 c	5,78	18,32 b

Rangos medios con letras distintas en una columna difieren estadísticamente según Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$.

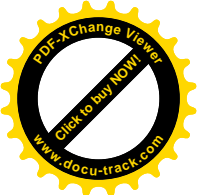
Para las variables peso neto del racimo, número de manos por racimo y número de frutos por mano se observaron diferencias significativas entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro* y semilla asexual. Sin embargo, el número de frutos difirió entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro* debido a que la línea celular 18 mostró el mayor valor. Con respecto al número de hojas funcionales no se observaron diferencias entre las plantas procedentes de la línea celular 4, plantas de organogénesis y de semilla asexual, a los 14 meses de la plantación. La línea celular 18 presentó el mayor número de hojas funcionales difiriendo significativamente de las demás poblaciones (Tabla 4).



Figura 4. Plantas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' procedentes de embriones somáticos a los 14 meses de plantadas en el campo.

Los resultados de la evaluación de las variables agronómicas muestran que las plantas procedentes del cultivo *in vitro* presentan mejores rendimientos que las plantas de semilla asexual en el cv. híbrido 'FHIA-21'. Estos resultados confirman los descritos por diferentes autores como Côte *et al.* (2000), los cuales al evaluar en el campo 500 plantas de 'Grande Naine' (*Musa AAA*) regeneradas de suspensiones celulares señalaron que todas mostraron un comportamiento agronómico similar al de las plantas producidas por el método de cultivo *in vitro* de brotes axilares.

Al respecto, López *et al.* (2005), al evaluar la respuesta en condiciones de campo de las plantas del cv. 'Navolean' obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis obtuvieron una respuesta significativamente superior en todas las variables agronómicas evaluadas en relación a las plantas procedentes de semilla asexual. Estos autores señalaron que el peso del racimo de las plantas provenientes de embriones somáticos fue de 10,10kg por planta, difiriendo significativamente con el peso de los racimos procedentes de semilla asexual (8,48kg).



4.2.3. Caracterización molecular mediante AFLP de las plantas regeneradas por embriogénesis somática.

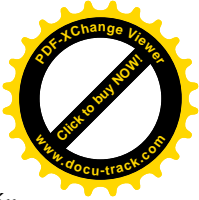
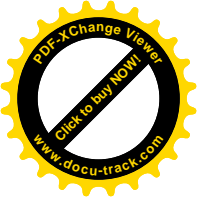
Los resultados obtenidos mediante la técnica de AFLP con las combinaciones estudiadas mostraron un total de 196 bandas, correspondientes a 58 (E-AAT / T-ACA), 68 (E-AGG / T-AGT) y 70 (E-ACA / T-ATG) bandas. El 100% del total de bandas analizadas en las combinaciones utilizadas no mostraron polimorfismo en las muestras de plantas procedentes de embriones somáticos, organogénesis y semilla asexual.

Como fue posible derivar de lo anterior, la distancia filogenética estimada a partir de los caracteres polimórficos estudiados, en todos los casos fue de 0,0. En la figura 5 se muestra un ejemplo de bandas monomórficas obtenidas por AFLP con la combinación de cebadores E-AGG/ T-AGT.

En la literatura científica la utilización de los marcadores AFLP en el género *Musa* ha estado encaminada a estudios de diversidad genética (Wong *et al.*, 2001; Tugume *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007) y a la evaluación de variaciones genéticas entre germoplasma y variantes somaclonales estrechamente relacionadas (Hernández *et al.*, 2007). Sin embargo, son poco trabajos que determinan los bajos niveles de variaciones inducidos por el cultivo de tejidos.



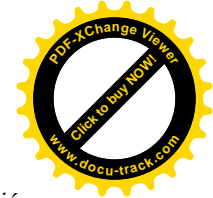
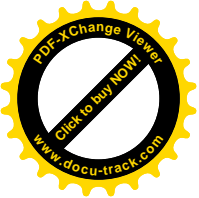
Figura 5. Patrones de bandeado observados mediante la técnica de AFLP con el empleo de la combinación de cebadores E-AGG/ T-AGT. Las muestras se presentan de izquierda a derecha: Líneas embriogénicas 4 y 18, organogénesis y semilla asexual.



Resultó importante entonces, determinar la significación estadística de este resultado en términos del cubrimiento total de bandas generadas tras la digestión enzimática del genoma de las plantas estudiadas, mediante la amplificación dirigida por los adaptadores empleados en este estudio durante la técnica AFLP.

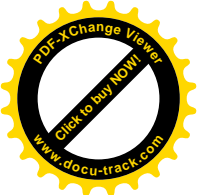
El análisis de la distribución de frecuencias de las 64 combinaciones posibles para los adaptadores de *EcoRI* y *Tru9* (Figura 6) permitió establecer el límite teórico del potencial máximo de cubrimiento de polimorfismo para el genoma de *Musa acuminata* (PMCP). Este valor resultó ser de 34,51 unidades porcentuales, como resultado de la multiplicación del cubrimiento de los adaptadores E-AAG (8,76) y T-TTT (3,94). Sin embargo los valores reales de cubrimiento obtenidos mediante las combinaciones empleadas fueron de: 1,27, 2,35 y 3,42. Puede apreciarse que estos valores resultan muy distantes del PMCP.

Estos resultados indican que el valor de la distancia filogenética obtenida no es conclusivo. Se necesitan estudios posteriores basados en la aplicación de combinaciones de adaptadores de mayor representación en el genoma de *Musa acuminata* para obtener un valor real.



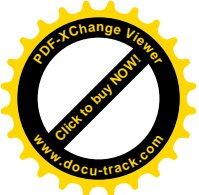
Los resultados obtenidos en campo durante la evaluación de los caracteres morfológicos muestran que la propagación de plantas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA-21' genera bajos porcentajes de variación somaclonal. Además, la evaluación de los caracteres agronómico mostraron mejores resultados en las plantas obtenidas por cultivo de tejidos con respecto a la semilla asexual. Por otra parte, los resultados logrados con los marcadores moleculares AFLP para las combinaciones de cebadores estudiadas no indican variaciones genéticas, estos resultados no son terminantes ya que se requieren de combinaciones de cebadores de mayor representación en el genoma de *Musa acuminata*.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron comprobar que el porcentaje de cambios fenotípicos detectables en casa de cultivo fue menor en las plantas regeneradas por embriogénesis somática respecto a las plantas de organogénesis. Estas plantas fuera de tipo recuperaron sus características morfológicas durante los 6 primeros meses de cultivo y solamente se observó una planta con cambio ("Grele") durante el ciclo de cultivo. Las plantas procedentes del cultivo *in vitro* presentaron los mejores resultados en las variables agronómicas (peso del racimo, número de manos/racimo y número de frutos/mano). Por otra parte, los resultados con los marcadores moleculares AFLP para las combinaciones de cebadores estudiadas no indican variaciones genéticas. Por tanto, los resultados de este trabajo nos permiten validar la embriogénesis somática para la propagación masiva *in vitro* del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21'.



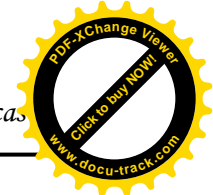
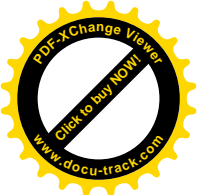
5. CONCLUSIONES

1. Se comprobó en casa de cultivo que el porcentaje de cambios fenotípicos en las plantas regeneradas por embriogénesis somática fue menor respecto a las plantas de organogénesis del cv. híbrido 'FHIA-21'.
2. Se confirmó que el porcentaje de variación somaclonal en las plantas regeneradas de embriones somáticos son bajos (0,02%) durante el ciclo de cultivo estudiado. Además, los mejores resultados en las variables agronómicas fueron en las plantas procedentes del cultivo *in vitro* (embriogénesis y organogénesis).
3. No se obtuvieron diferencias genéticas entre las plantas regeneradas por embriogénesis somática, organogénesis y semilla asexual para las combinaciones de cebadores estudiadas. Los resultados de la estimación de la distancia filogenética indican que se requieren de combinaciones de cebadores de mayor representación en el genoma de *Musa acuminata*.



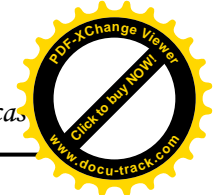
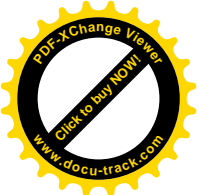
6. RECOMENDACIONES

- ✚ Evaluar durante un segundo ciclo de cultivo en campo las plantas regeneradas de embriones somáticos, organogénesis y semilla asexual.
- ✚ Emplear combinaciones de cebadores de mayor representación en el genoma de *Musa* según la estimación estadística de la distancia filogenética.

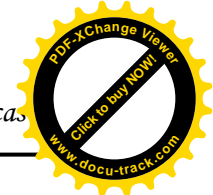
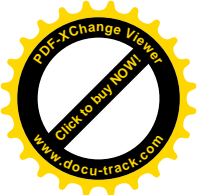


7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

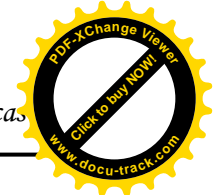
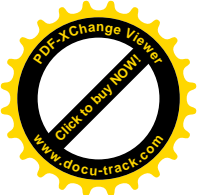
1. Aga E y Bryngelsson T (2006) Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis of genetic variability in forest coffee (*Coffea arabica* L.) from Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53:721-728.
2. Álvarez JM y Rosales FE (2004) Guía de campo para la identificación de los principales híbridos de banano y plátano de la FHIA. XVI Reunión Internacional ACORBAT. Publicación Especial. Oaxaca, México. pp. 184.
3. Aly MAM, Rathinasabapathi B y Kellay K (2002) Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, *Plumbaginaceae*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 68:127-135.
4. Arya S, Kalis RK y Arya ID (2000) Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. *Plant Cell Rep.* 19:775-780.
5. Belalcázar S (1991). El cultivo del Plátano en el trópico. ICA. Cali, Colombia.
6. Berrie AM (1997) The *Musaceae*: the bananas. En: An introduction to the botany of the major crop plants. Heyden, Londres. pp. 113-116.
7. Botstein D, White RL, Skolnick M y Davis RV (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Amer. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
8. Bowers JE, Bandman EB y Meredith CP (1993) DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Ann. J. Enol. Vitis.* 44:266-274.
9. Brar DS y Jain SM (1998) Somaclonal variation: Mechanism and applications in crop improvement. En: Jain SM *et al.*, 1998 (eds.). Somaclonal variations and induced mutations in crop improvement. Dordrecht, Kluwer, UK. pp. 15-37.
10. Carreel F, Gonzalez de Leon D, Lagoda P, Lanaud C, Jenjy C, Horry JP y Tezanas du Montcel H (2002) Ascertaining maternal and paternal lineage within



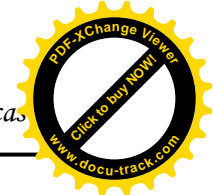
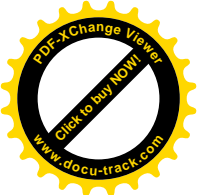
- Musa* by chloroplast and mitochondrial DNA-RFLP analysis. *Genome*, 45:679-692.
11. Chalyk S (2007) Haploids and doubled haploids: their generation and application in plant breeding. En: Section 5. Tools in plant breeding (Chapter 11). Tissue culture and the breeding of clonally propagated plants. Somaclonal variation. Principles of Plant genetics and Breeding. Blackwell Publishing, Australia. 193 p.
 12. Cheung F y Town DC (2007) A BAC end view of the *Musa acuminata* genome. *BMC Plant Biology*, 7:29-33.
 13. Choi YE, Kim JW y Yoon ES (1999) High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann. Bot.* 83:309-314.
 14. Choi YE, Ko SK, Lee KS y Yoon ES (2002) Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69:201-204.
 15. Cote F, Perrier X y Teisson C (1993) Somaclonal variation in *Musa* sp: Theoretical risks and risk management. Future research prospect. En: Biotechnology applications for banana and plantain improvement Proceeding of an INIBAP Workshop held in San José Costa Rica. pp. 192-199.
 16. Cote F, Folliot M, Domergue R y Dubois C (2000) Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA cv. 'Grand Naine'). *Euphytica*, 112:245-251.
 17. Crouch HK, Crouch JH, Madsen S, Vuylsteke DR, Ortiz R (2000). Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., AAB group). *Theor. Appl. Genet.* 100:1056-1065.
 18. Dahleen LS (1996) Molecular marker analysis of hypoploid regenerants from cultures of barley x Canada wild rye. *Genome*, 39:367-372.



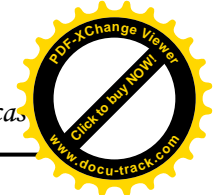
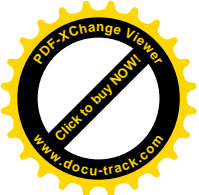
19. Damasco O, Graham G, Henry R, Adkins S, Smith M y Godwin D (1996) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Rep.* 16:118-123.
20. Daniells JW, Smith MK y Hamill SD (1999) Banana off-types. An illustrated Guide. Queensland, Horticulture Institute-INIBAP. pp 23.
21. Daniels D, Kosky R y Vega M (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA-21 (*Musa* spp. AAAB Group). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 38:330-333.
22. de Feria M, Quiala E, Chávez M, Molejón L, Peralta E, Hernández M, Rodríguez A, Mirabal D y Sánchez Y (2005) Efecto de la frecuencia de inmersión y la disponibilidad de medio de cultivo en la multiplicación del cv. híbrido FHIA 21 (*Musa* AAAB) en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 5(1): 9-15
23. De Vicente CM y Fulton T (2003) Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje. IPGRI e IGD, Cornell University.
24. Dhed'a D (1992) Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et regeneration en plantules par embryogénese somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.). PhD Thesis, KU Leuven, Belgium, 167 pp.
25. Dolezelova M y Harry JP (1999) Flow cytometric analysis of nuclear DNA contents in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetic* 98(8):1344-1350.
26. Engelborghs I, Remy S y Swennen R (1999) Fluorescent AFLP's to detect dwarfism. The case of banana 'Curare Enano' (*Musa* spp.), *InfoMusa* 8(1) (ProMusa-V-VI) Abstract.



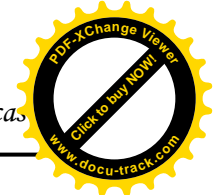
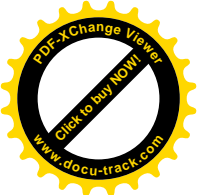
27. Escalant JV, Teisson C y Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro Cell Dev. Biol* 30:181-186.
28. FHIA (2002) En línea: <http://www.fao.org>. Consulta 3 de mayo de 2006.
29. FHIA (2007) Bananos y plátanos de la FHIA para la seguridad alimentaria. En: FHIA INFORMA. Año16. No. 1. FHIA. pp 6-8.
30. FAO (2006) Banano, notas sobre productos básicos: situación del mercado del banano en 2005 y comienzos de 2006. En línea: <http://www.fao.org>. Consulta 7 de enero de 2007.
31. FAO (2006) Glossary of biotechnology for food and agriculture. A revised and augmented edition of the Glossary of biotechnology and genetic engineering. Título 9 de la serie Estudios FAO: Investigación y tecnología. En línea: www.fao.org/sd/kn4_es.htm. Consulta 4 de noviembre de 2006
32. Fehér A, Pasternak TP y Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 74:201-228.
33. Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
34. Find JI, Kristensen MMH, Norgaard JV y Krogstrup P (1998) Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway Spruce and Sitka spruce. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53:27-33.
35. García L, Pérez J, Bermúdez I, Orellana P, Veitía N, García L, Padrón Y y Romero C (2002) Estudio comparativo de la variabilidad producida por la inducción de mutaciones y el cultivo de tejidos en banano (*Musa* sp.) cv 'Grande naine'. *Infomusa*. 11(2):4-6.



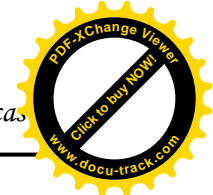
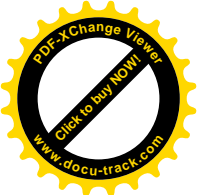
36. García L, Pérez B, Sarría Z y Clavero J (2002) Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-20. Infomusa 11(1):35-38.
37. García-Águila L, Kosky R, Chong B, Reyes M, Freire-Seijo M y Alvarado-Capó Y (2006) Obtención de plantas del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) a partir de líneas celulares embriogénicas. Biotecnología Vegetal 6(2):9-12
38. García-Águila L, Kosky R, Chong B, Reyes M, Freire-Seijo M y Alvarado-Capó Y (2007) Influencia de las condiciones de iluminación en la germinación de embriones somáticos del cv híbrido FHIA 21. Revista de Agronomía 24(4):
39. Ge XJ, Liu MH, Wang WK, Schaal BA y Chiang TY (2005) Contrasting population structuring of wild banana, *Musa balbisiana*, in China based on evidence between microsatellite fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. Mol. Ecol. 14:933-944.
40. Gómez R (1998) Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 57-77.
41. Gómez KR, Barranco LA, Chong PB, Daniels D, Reyes VM y de Fera SM (2006) Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar FHIA-18 plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. Euphytica, 150:63-68.
42. González CL (1995) Evaluación, detección y métodos de control de Variación Somaclonal en el clon Gran Enano (*Musa* spp.) (AAA). Tesis en opción del Grado Académico de Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. 50 pp.
43. Grapin A (1995) Regeneration par embryogenese somatique en milieu liquide et transformation genetique par biolistique de bananiers di et triploides. PhD Thesis, Montpellier, France. 90 pp.



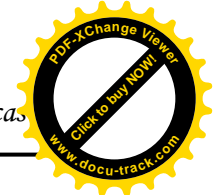
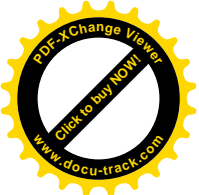
44. Grapin A, Schwendiman J y Teisson C (1996) Somatic embryogenesis in banana plant. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 32:66-71.
45. Gubbuk H, Pekmezci M, Omus AN y Erkan M (2004) Identification and selection of superior banana phenotypes in the cultivar Dwarf Cavendish using characteristics and RAPD markers. *Pakist. J Bot.* 36: 331-342.
46. Gutiérrez LG (2002) “Embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares”, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España.
47. Gutiérrez GL (2004) Marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de aliso *Alnus acuminata* H.B.K. *Scientia et Technica.* UTP 25:285-289.
48. Hamidah M, Abdul Karim AG y Debergh P (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48:179-199.
49. Hernández R, Rodríguez R, Ramírez T, Cañal MJ, Guilén D, Noceda C, Escalona M, Corujo M y Ventura J (2007) Genetic and morphoagronomic characterization of plantain variants of *Musa* AAB clone CEMSA ¾. *J. Food, Agriculture and Environment* 5(1):220-223.
50. IBP (2005) Protocolos para la micropropagación cultivares de plátanos y bananos mediante organogénesis. Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
51. INIVT (2007) Instructivo técnico del cultivo del plátano. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. Biblioteca ACTAF, primera edición. pp. 21.
52. IPGRI/INIBAP/CIRAD (1996) Descriptores para el Banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano. Montpellier, Francia y Centre de



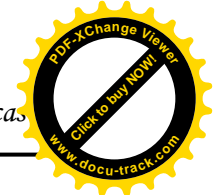
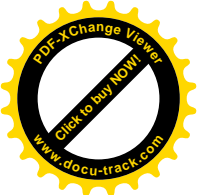
- Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, Francia. pp. 55.
53. Israeli Y, Reuveni O y Lahav E (1991) Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by in vitro techniques. *Scientia Horticulturae*, 48(1-2):71-88.
54. Israeli Y, Lahav E & Reuveni O (1995) *In vitro* culture of bananas. En: Gowen S (ed) *Bananas and Plantains*. London. pp. 147-178.
55. Israeli Y, Ben-Bassat D y Shchukin A (2000) A simple procedure for indirect somatic embryogenesis and plant regeneration in Grand Naine bananas. Effect on off-types rate. CD-MUSADOC.
56. James AC, Peraza-Echeverría S, Herrera-Valencia V y Martínez O (2004) Applications of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) and the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) techniques for the detection of DNA polymorphism and changes in DNA methylation in micropropagated bananas. En: MS Jain y R Swennen (eds.) *Banana Improvement. Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*. Science Publishers, Inc. pp. 287-306.
57. Jayasankar S, van Aman M, Li Z y Gray DJ (2001) Direct seeding of grapevine somatic embryos and regeneration of plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 37:476-479.
58. Javed MA, Chai M y Othman RY (2004) Study of resistance to *Fusarium oxysporum* using RAPD markers. *Biol. Plant.* 48:93-99.
59. Javed MA y Othman RY (2005) Characterization of *Fusarium* wilt-resistant and *Fusarium* wilt-susceptible somaclones of banana cultivar Rastali (*Musa* AAB) by Random Amplified Polymorphic DNA and Retrotransposon markers. *Plant Molec. Biol. Rep.* 23:241-249.



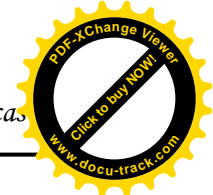
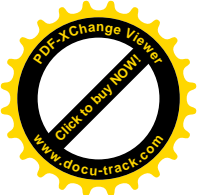
60. Jiménez E (1998) Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez Ponce, JN (ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 13-22.
61. Jiménez-Terry F, Ramírez D y Agramonte D (2002) Empleo del BIOBRAS-6 en la micropropagación del cultivar de plátano FHIA 21 (*Musa AAAB*). *Biotecnología Vegetal* 2(3): 131-136
62. Kaepler SM, Kaepler HF y Rhee Y (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:179-188.
63. Kochert GWA y Wetzstein HY (1999) AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 18:853-857.
64. Lagoda P, Noyer J, Dambier D, Baurens F, Grapin A y Lanaud C (1998) Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the *Musaceae*. *Molecular Ecology*, 7:657-666.
65. Larkin PJ y Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation: A novel source of genetic variability from cell cultures for improvement. *Theor. Applied Genetic*, 60:197-204.
66. López ZM (1989) El plátano. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba.
67. López J, Gómez R, Toledo H, Montano N, Rayas A, Reinaldo D, Chong B, Cabrera M, Santos A, Ventura J, Medero V, García M, Basail M, Cantero A y Arbel J (2005) Evaluación en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares en cv. 'Navolean' (*Musa spp.*, AAB). *Biotecnología Vegetal* 5(2):115-120.
68. Marie P (1993) Utilization des viroplants de bananiers aux Antilles françaises: atouts et contraintes. *Fruits* 48(2):89-94.



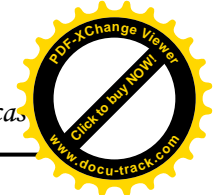
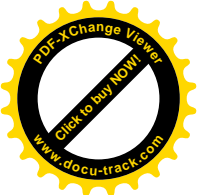
69. Martin KP, Pachathundikandi SK, Zhang CL, Slater A y Madassery J (2006) RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42:188-192.
70. Matsumoto K, Styer Caldas L e Yamamoto Y (2006) Respuesta de variantes somaclonales enanas de bananos a la benzilaminopurina. *InfoMusa* 15(1-2): 27-29.
71. MINAGRI (1994) Instructivo Técnico para el Cultivo del Plátano. Ministerio de la Agricultura La Habana, Cuba, CIDA. 85 p.
72. Medina C, García I, Caro M y Aristizábal FA (2007) Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 36 (1):70-80
73. Morales C, Santana N, Xiqués X, Reinaldo I, Martínez B y Rodríguez S (1996) Variabilidad en somaclones de tomate del cultivar Campbell-28. *Cultivos Tropicales* 17(1):66-70.
74. Morpurgo R, Brunner H, Grasso G, van Duren M, Roux N y Afza R (1997) Enigma of banana breeding. A challenge for biotechnology. *Agro-Food-Industry Hi-Tech. Plant Breeding Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Austria.* pp. 16-21.
75. MUSADOC (2000) International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Parc Scientifique Agropolis. Montpellier, Francia. Disco compacto. ISBN: 2-910810-39-9.
76. Nalina L, Kumar N, Soorianathasundaram K, Kennedy JS, Krishnamoorthu V, Ganga M (2006) Iniciación y diferenciación del brote en las plantas de Robusta (AAA) derivado de los retoños y de las plántulas cultivadas a partir de tejidos. *InfoMusa.* 15(1-2):23-25.



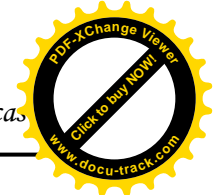
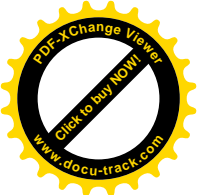
77. Ortiz R, Ulburghs y Okoro JU (1998) Variación estacional de la fertilidad aparente de las manchas y de la producción de polen $2n$ en plátanos y bananos. Hort. Science 33(1):146-148.
78. Osuji J, Vuylsreke D y Ortíz R (1997) Variación de ploidía en híbridos procedentes de cruces $3x \times 2x$ interploides en *Musa*. Tropicultura 15(1):37-39.
79. Pérez JP (1992) Mejoramiento convencional vs cultivo *in vitro*. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. pp. 1-13.
80. Pérez JN y Orellana P (1994) *Musa* Improvement in Cuba. En: Jones DR (Ed) The improvement and testing of *Musa*: A Global Partnership. Honduras. pp. 203-206.
81. Pérez JN, Agramonte D, Jiménez F y Ramírez A (1999) Informe final del proyecto "Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV, enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos" IBP, Santa Clara. 178 pp.
82. Phillips RL, Kaepler SM y Peschke VM (1995) Do we understand somaclonal variation? Pages 131-141 En: Nijkamp HJJ y van Aartrijk J (eds.) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.
83. Pillay N, Nwakanma DC y Tenkouano A (2000) Identification of RAPD markers to A and B genome sequences in *Musa* L. Genome. 43:763-767.
84. Pillay M, Ougundidiwin E, Nwakanma DC, U de G y Tenkouano A (2001) Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germoplasm. Theor Appl Genet. 102:965-970.
85. Polanco C y Ruiz ML (2002) AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. Plant Science, 162:817-824.



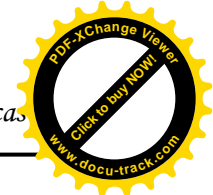
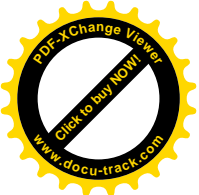
86. Powell W, Morgante M, Andre Ch, Haneefey M, Vogel J, Tingey S y Rafelski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Mol. Breed.* 2:225-238.
87. Quiros CF (1991) Enzyme patterns of a hybrid between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*. *J. Hered.* 66:45-47.
88. Raboin LM, Carreel F, Noyer JL, Baurens FC, Horry JP, Bakry F, Tezenas Du Montcel H, Ganry J, Lanaud C y Lagoda PJL (2005) Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: molecular identification of 2n restitution gamete donors and n gamete donors. *Mol. Breed.* 16:333-341.
89. Rallo OP, Belaj A, De la Rosa R y Trujillo I (2002) Marcadores moleculares (en línea) Córdoba, España. En línea: <http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio2000/almazara/lamzara1.htm>. Consulta 1 de agosto de 2006.
90. Ramaje CM, Borda AM, Hamill SD y Smith MK (2004) A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas (*Musa* spp. AAA). *Sci. Hort.* 103:45-151.
91. Ramos EMJ, Palma GRD y Hernández-Sotomayoca SMT (2003) Changes in phosphatidylinositol and phosphatidylinositol monophosphate kinase activities during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea Arabica*. *Physiologia Plantarum* 119:270-277.
92. Ray T, Dutta I, Saha P, Das S y Roy SC (2006) Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85:11-21.
93. Reuveni O e Israeli Y (1990) Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. *Acta Horticulturae*, 257:307-313.



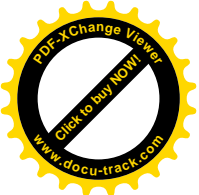
94. Reuveni O (1990) Methods for detecting somaclonal variants in Williams bananas. En: Identification of genetic diversity in the genus *Musa*, an International Workshop. INIBAP Montpellier, France. pp 108-113.
95. Reuveni O, Israeli Y e Lahav E (1996) Somaclonal variation in banana and plantain (*Musa* species). En: Y.P.S. Bajaj (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 36, Somaclonal variation in crop improvement II. Springer-Verlag, Berlin. pp. 174-196.
96. Rohde (1996). Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. J. Genet. Breed. 50:249-261.
97. Rodríguez M y Arencibia A (2002) Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas (Capítulo 1). En: Cornide HMT (ed.) Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas. Editorial Félix Varela. pp 13-35.
98. Rojas W (2003) Análisis de la variabilidad genética en Quinoa. Boletín Técnico Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) 8:27-39.
99. Sandoval JF y Escoute J (1996) Aspectos citológicos y descripción de una metodología para el conteo de los cromosomas en el género *Musa*. Corbana 21(45):51-56.
100. Sandoval JF, Cote J y Escoute J (1997) Chromosome number variations in micropropagated true-to-type banana plants (*Musa* AAA cv Grande Naine). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 32:14-17.
101. Silvana C, Tulmann A, de Oliveira S, Figueira A (2003). Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. Euphytica, 132: 259-268.
102. Simmonds NW (1966) Bananas. 2 ed. Longmans, Green London. 535 p.



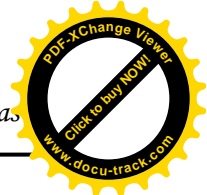
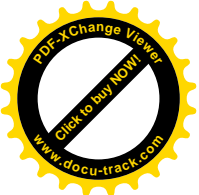
103. Sobri H, Rusli I, Anna LPK, Mohd Fadzillah N y Daud SK (2005) Micropropagation of *Eurycoma longifolia* via formation of somatic embryogenesis. *Asian J. Plant Sci.* 4:472-485.
104. Sobri H, Rusli I y Ling Pick KA (2006) Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropropagation. *Iranian J. Biotech.* 4(3):156-161.
105. Soto RH (1985) Bananas. Cultivos y comercialización. San José: Litografía e imprenta S.A. 648 p.
106. Schoofs H (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. PhD thesis. K. V. Leuven, Belgium.
107. Schoofs H, Panis B, Strosse H, Mosqueda-Mayo A, López-Torres J, Roux N, Dolezel J y Swennen R (1999) Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *Infomusa* 8(2):3-8.
108. Shchukin A, Ben-Bassat D e Israeli Y (1998) Somaclonal variation and horticultural performance of Grand Naine bananas multiplied via somatic embryogenesis or shoot-tip culture. En: *Proceeding of the IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. June 14-19, Jerusalem, Israel. pp. 151.
109. Smith M y Hamill S (1993) Banana tissue culture. Banana industry protection board of Queensland. Australia. Strategic Plan 1994-99/Annual report 1993-1994. pp. 27-29.
110. Takayama S y Akita M (1996) Biorreactor advances for the large-scale production of propagules. Cost 822 Workshop on somatic embryogenesis, artificial seeds and bioreactors. Sanremo, 6-7 September. 2 p.



111. Tanskley SD y Orton TJ (1983) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A (eds.) Amsterdam, Elsevier. pp. 109-138.
112. Tajavathi DH, Laksmi Sita G y Sunita AT (2000) Somatic embryogenesis in *Flax*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 63:155-159.
113. Thu NX, Oanh LTL y Nhi HH (2002) Utilización de la técnica RAPD para la identificación y clasificación de algunos cultivares de banano en Vietnam. Infomusa. 11:48-49.
114. Tugume AK, Lubega GW y Rubaihayo PR (2002) Diversidad genética de los bananos de altiplanos de África Oriental utilizando AFLP. Infomusa 11(2):28-32.
115. Uma S, Siva SA, Saraswathi MS, Manickavasagam M, Durai P, Selvarajan R y Sathiamoorthy S (2006) Variation and intraspecific relationships in India wild *Musa balbisiana* (BB) population as evidenced by Random Amplified Polymorphic DNA. Gen. Resour. Crop Evol. 53:349-355.
116. Van Harten AM (1997) Mutation breeding in vegetatively propagated crops. 15th IAEA/FAO interregional training course on advances in technologies for induced mutations in crops. Seibersdorf, Austria. 92 p.
117. Venkatachalam L, Sreedhar RV y Bhagyalakshmi N (2007) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shorts of banana using RAPD and ISSR markers. E. J. Biotechnol. 10(1):106-112. En Línea: www.ejbiotechnology.info/content/vol10issue1/full/12/
118. Vidal MC y García E (2000) Analysis of *Musa* spp somaclonal variant resistant to yellow sigatoka. Plant Molec. Biol. Rep. 18:23-31.
119. Villalobos VM y Thorpe TA (1993) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca WM y Mroginski LA (eds.) Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. pp. 219-231.



120. Visser AH (2001) Characterization of banana and plantain using random amplified polymorphic DNA markers. *Horticult. Abstr.* 72:2.1154.
121. Von Arnold SV, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J y Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 69:233-249.
122. Vos P, Hodgers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee Y, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Oxford University Press. *Nucleic Acids Research*, 23(21):4407-4414.
123. Vuylsteke DR, Swennen RL y De Langhe ED (1996) Performance of somaclonal variants of plantain (*Musa* spp., AAB Group). *Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:42-46.
124. Vuylsteke DR, Crouch JH, Pellegrineschi A y Thottappilly G (1998) The biotechnology case history for *Musa*. En: Proc. Int. Symp. Biotechnology Tropical and Sunropical Species. R. A Drew (ed). *Acta Hort.* 461.
125. Vuylsteke D (2000) Breeding bananas and plantains: from intractability to feasibility. *Acta Hort.* 540 149-156.
126. Vuylsteke D (2001) Strategies for utilization of genetic variation in plantain improvement. Thesis Philosophy in Agricultural and Applied Biological Sciences. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. 206 pp.
127. Wang X (1997) Somatic embryo induction and plant regeneration in American Ginseng (*Panax quinquefolium* L.) M.Sc. Thesis, University of Guelph, Canada.
128. Wan Y, Watanabe JA, Yi SS, Htaik T, Win K, Yamnaka S, Nakamura I y Watanabe N (2005) Assessment of genetic Diversity among the major Myanmar banana Landraces. *Breed. Sci.* 55:365-369.



129. Wang LX, Chiang YT, Roux N, Hao G y Ge JX (2007) Genetic diversity of wild banana (*Musa balbisiana* Colla) in China as revealed by AFLP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54:1125-1132.
130. Withers LA (1992) Early detection of somaclonal variation. *Proceeding of the Workshop on Biotechnology Applications for Bananas and Plantain Improvement, San José*, 1:475-482.
131. Wong C, Kiew R, Loh JP, Gan HL, Set O, Lee SK, Lum S y Gan YY (2001) Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. *Ann. Bot.* 88:1017-1025.
132. Wong C, Kiew R, Argent G, Set O, Lee KS y Gan YY (2002) Assessment of the validity of the sections in *Musa* (*Musaceae*) using AFLP. *Ann. Bot.* 90:231-238.
133. Williams JGK, Kubeli AR, Libak KJ, Rafalski JA y Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
134. Withers LA (1992) *In vitro* conservation. En: F.Hammerschlag and R.E.Litz (eds) *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*", CAB International. En línea: www.fao.org/docrep/006/t2114e/T2114E15.htm. Consulta 6 de marzo de 2004.
135. Yantcheva A, Vlahova M y Antanassov A (1998) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *Plant Cell Rep.* 18:148-153.
136. Zabeau M, y Vos P (1993) Selective restriction fragment amplification: a general strategy method for DNA fingerprinting. European Patent Application number: 92402629.7 Publication number 0534858 A1