

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

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

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

RESUMEN

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

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

Biotechnología Aplicada 2014;31:18-22

ABSTRACT

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

Keywords: acclimatization, banana, genetic stability, growth regulators

Introducción

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Materiales y métodos

Plantas de banano, técnicas de cultivo y tratamientos

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

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

La formulación de ABr contiene como ingrediente activo el análogo espiroestánico de brasinoesteroides 25(R)-2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona, conocida como Biobras-6 (Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba). La fórmula general de este compuesto es C₂₇H₄₂O₅ y su masa molar de 446.606 g/mol. La mezcla conocida como Pectimorf (mOLG), con grado de polimerización entre 9 y 16, se obtuvo en el Laboratorio de Oligosacarinas (Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba), a partir de la pectina de la corteza de los frutos de lima persa (*Citrus latifolia* Tan), con una masa molar promedio de 2042 g/mol.

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

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

En la fase de aclimatización *ex vitro*, se evaluaron los tratamientos: T₁, plantas madres provenientes del campo, vigorosas y sin síntomas visibles de enfermedades virales, fungosas o bacterianas (control); T₂, plantas provenientes del cultivo *in vitro* (obtenidas con AIB, AIA y 6-BAP), las raíces de las vitroplantas se sumergieron en 0.1 % de Ridomil (producto comercial Ridomil MZ al 72 %, de acción sistémica y de contacto); T₃, plantas obtenidas *in vitro* con ABr; y T₄, plantas obtenidas *in vitro* con la mOLG. El primer tratamiento no se incluyó en el estudio citogenético de las plantas.

Antes de la plantación, las raíces de las plantas tratadas con ABr y la mOLG se sumergieron en las soluciones de ABr 0.2 μ mol/L y de la mOLG 0.47 μ mol/L; T₃ y T₄, respectivamente; y 15 días después de la plantación, las plantas se asperjaron con las mismas concentraciones de estos reguladores del crecimiento, a razón de 2 mL por vitroplanta.

La plantación se hizo en bandejas de poliestireno expandido de 70 alvéolos, cuyas dimensiones eran 5 x 5 x 5 cm (125 cm³), que contenían un sustrato compuesto por una mezcla en volumen de 75 % de materia orgánica (cachaza descompuesta), más 25 % de suelo ferralítico rojo compactado. Estas bandejas se transfirieron a condiciones semicontroladas, en una casa de cultivo tapado de malla de polipropileno al 30 % (densidad de flujos de fotones fotosintéticos 600 μ mol/m²/s).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El riego fue por microaspersión (2 kg/cm² y un caudal de 120 L/h), mediante un sistema Microjet®, con una frecuencia de 4 riegos al día durante 2 min cada uno, los primeros 7 días, para lograr una humedad relativa del 90 %.

Análisis citogenético radicular

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

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

Análisis isoenzimático

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

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

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

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

Análisis molecular mediante la técnica de RAPD

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

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

(5 mg/mL) y observados en un transiluminador (Bio-block Scientific, Francia). La concentración se estimó por la medición de la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro Ultrasepec Plus Spectrophotometer (Pharmacia LKB, Inglaterra). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 25 µL, que contenía: Tris-HCl 10 mM, pH 8.3; KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, gelatina 0.001 %, cada dNTP a 100 µM, 5 pmoles de cebador (Kits OPA y OPF; Operon Technologies, Alameda, California Inc.), 50 ng de ADN genómico y 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega). Se emplearon seis cebadores arbitrarios: OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3'), OPA-10 (5'-GTGATCGCAG-3'), OPA-11 (5'-CAATCGCCGT-3'), OPA-13 (5'-GGCTGCAGAA-3'), OPF-04 (5'-GGTGATCAGG-3') y OPF-13 (5'-GGCTGCAGAA-3') [20, 33].

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

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

Resultados y discusión

Análisis citogenético radicular

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Análisis isoenzimático

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

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

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

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

Análisis molecular mediante RAPD

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

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

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

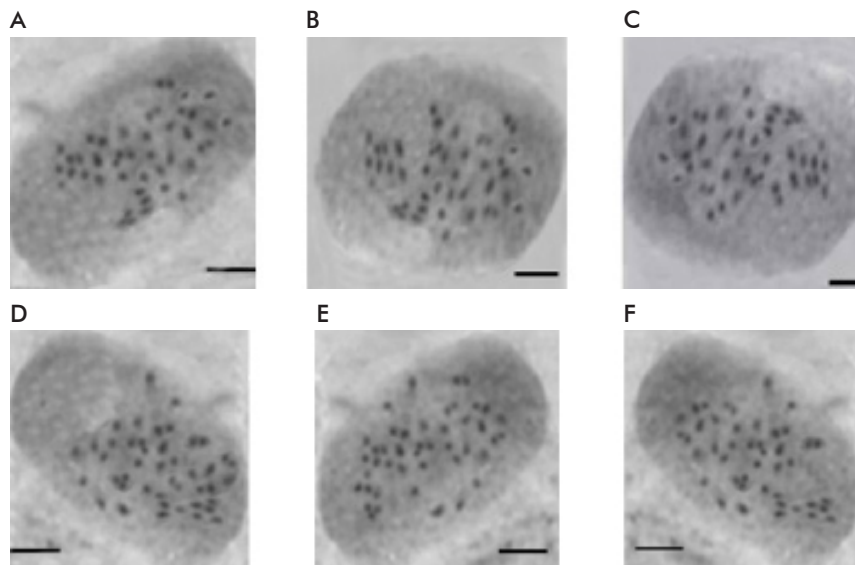


Figura 1. Células de plantas de banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18' (AAAB) en metafase mitótica en el tratamiento control (inicio: A y final: D), con el empleo de ABr (inicio: B y final: E) en todas las fases y de la mOLG (inicio: C y final: F) durante la aclimatación, con número de cromosomas $2n =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

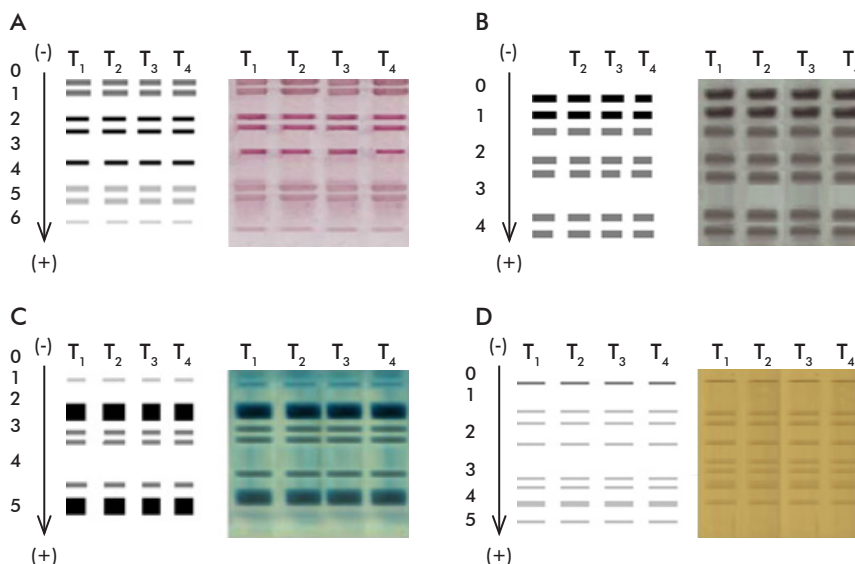


Figura 2. Evaluación isoenzimática de las plantas de banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18' (AAAB) obtenidas con el empleo de los análogos de brasinoesteroides (ABr) y de la mezcla de oligogalacturónidos (mOLG), mediante sistemas isoenzimáticos durante la fase de aclimatación. A) anhidrasa carbónica. B) esterasas. C) peroxidasas. D) polifenoloxidasas. Se aplicaron los siguientes tratamientos: T₁, plantas madre procedentes de campo - control; T₂, plantas obtenidas *in vitro* - control sin inmersión de las raíces de las plántulas durante 15 minutos antes de la plantación (I), ni aspersión foliar de las plántulas durante 15 días después de la plantación (AF); T₃, plantas obtenidas *in vitro* con I + AF de ABr ($0.2 \mu\text{mol/L}$); T₄, plantas obtenidas *in vitro* con inmersión + AF de mOLG ($0.47 \mu\text{mol/L}$).

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusiones

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

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

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

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

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

Recibido en junio de 2013.

Aprobado en octubre de 2013.

Genetic stability of micropropagated banana plants (*Musa spp.*) with non-traditional growth regulators

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: acclimatization, banana, genetic stability, growth regulators

Biotechnología Aplicada 2014;31:23-27

RESUMEN

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

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

Introduction

Organogenesis is one of the plants regeneration methods using *in vitro* culture. It is widely used in micropropagation, genetic transformation and plants development studies [1]. In the last decade of the last century a great progress was made in the field of plant genetics, molecular biology, cell cycle and signal transduction of cytokinins and auxins [1, 2]. There were also advances in the knowledge of morphological and physiological aspects of *in vitro* organogenesis and also in the molecular mechanisms governing this response. Besides, the relationships between auxins cytokinins and other growth promoting substances like brassinosteroids and their analogues, as well as oligogalacturonides, are being actively although slowly investigated [2-5].

Occasionally, the growth regulators incorporated into the plant culture medium promote genetic or epigenetic changes. In this regard, the synthetic auxin known as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

is often employed for callus induction. Nevertheless, 2,4-D is the main responsible for genetic and epigenetic variation [6] in some tissues, so it is not recommended in plants massive micropropagation protocols. Alternative like the use of cytokinins such as zeatin, kinetin and 6-benzylaminopurine (6-BAP) may also promote chromosomal aberrations at high concentrations in the culture media [7, 8].

Therefore, brassinosteroid analogues (ABr) and the oligogalacturonides mixture (MOGs) can be used as substitutes of auxins and cytokinins in several biotechnological processes [9, 10]. These non-traditional growth regulators are conveniently used in different micropropagation steps of banana and plantain (*Musa spp.*). It has also been reported that Biobras (6-ABr) attenuated the stress to high temperatures in banana 'FHIA-18' during the acclimatization phase [11] and favored root formation *in vitro* during the rooting stage of Banana 'FHIA-21' [12]. Moreover, the

1. Zhang S, Lemaux PG. Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. Crit Rev Plant Sci. 2004;23(4):325-35.

2. Perilli S, Moubayidin L, Sabatini S. The molecular basis of cytokinin function. Curr Opin Plant Biol. 2010;13(1):21-6.

3. Benková E, Hejálko J. Hormone interactions at the root apical meristem. Plant Mol Biol. 2009;69(4):383-96.

4. González-García MP, Villarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-García S, Russinova E, et al. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. Development. 2011;138(5):849-59.

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

Pectimorf (mOLG) reduced the output time of the 'Sobrino' plantain clone explants during its *in vitro* establishment [13].

The *ex vitro* growth of plants obtained by somatic organogenesis or embryogenesis results from treatments applied at the *in vitro* propagation stage [14, 15]. However, regeneration of many plant species is not usually yet an efficient process.

The application of ABR and its analogues or mOLG stimulate several plant growth processes in *ex vitro* conditions, and reduce the abiotic stress induced *in vitro* by different culture techniques [10, 11, 16]. It has been reported [15] that the success of acclimatization in plantain and banana (*Musa* spp.) depends on plants transition from heterotrophic or mixotrophic conditions (mixture of autotrophic to heterotrophic) to autotrophy, a process related to the reserves obtained during *in vitro* culture.

Identification of genetic variability in plants obtained *in vitro* by morphological markers, although the most accepted technique, is not the only one employed due to its slowness. Hence, cytogenetic [17], isozyme [18] and molecular methods such as random amplification of polymorphic DNA (RAPD) [19] have become more effective and are widely used to assess the genetic stability of the regenerants. Additionally, they are commonly used in combination to evaluate the genetic variability of several crops including plantain and banana (*Musa* spp.) [19, 20], mandarin (*Citrus reshsni* Hort. Ex Tan) [21], sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) [22] and pineapple (*Ananas comosus* [Lindley] Coppins and Leal) var. Bracteatus [23], among others.

Since the possible impact of using nontraditional growth regulators (ABr and mOLG) at all stages of the *in vitro* plant propagation and in further *ex vitro* cultivation remains to be elucidated, this study was aimed at evaluating the genetic stability of banana plants (*Musa* spp.) cultivar 'FHIA-18' (AAAB) obtained by micropropagation *in vitro* when exposed to these nontraditional growth regulators, by combining cytogenetic, isozyme and molecular techniques.

Materials and methods

Banana plants varieties, farming techniques and treatments

For these experiments, 45-days-old banana plants of the FHIA-18' (AAAB) variety coming from the acclimation stage were used. These plants were first *in vitro* propagated at various concentrations of three traditional growth regulators (3-indole butyric acid, AIB; 3-indoleacetic acid, AIA and 6-BAP) or the nontraditional brassinosteroid analogue ABr or a mOLG of α -1,4-oligogalacturonides (Pectimorf-mOLG). Non-traditional growth regulators were only applied during the acclimatization phase.

The ABr formulation contains as active ingredients the brassinosteroid spirostane analogue 25(R)-2 α 3 α -dihydroxy-5 α -spirostan-6-one, known as 6-ABr (Center for Natural Products Research, School of Chemistry, University of Havana, Cuba). The general formula of this compound is C₂₇O₅H₄₂, with molar mass of 446.606 g/mol. The mixture known as Pectimorf-mOLG with polymerization degree between 9 and 16,

was obtained in the Oligosaccharines Laboratory (Department of Plant Physiology and Biochemistry, National Institute of Agricultural Sciences, Cuba). It was generated from pectin contained in bark of Persian lime (*Citrus latifolia* Tan) fruits with an average molar mass of 2042 g/mol.

The following treatments were performed during *in vitro* culture: Control (setting: 0.015 μ mol/L AIB + 17.77 μ mol/L 6-BAP; multiplication: 3.71 μ mol/L AIA + 17.77 μ mol/L 6-BAP and rooting: 7.42 μ mol/L AIA); ABr (setting: 17.77 μ mol/L 6-BAP + 0.02-0.01 μ mol/L ABr, multiplication: 17.77 μ mol/L 6-BAP + 0.1-0.2 μ mol/L ABr and rooting: 0.1 μ mol/L ABr) and mOLG (setting: 0.015 μ mol/L AIB + 0.47 μ mol/L mOLG; multiplication: 17.77 μ mol/L 6-BAP + 0.47-2.35 μ mol/L mOLG and rooting: 2.35-4.70 μ mol/L mOLG).

For culture media preparation, the previously described salts were used [24], supplemented with 0.30 μ mol/L thiamine, 15 μ mol/L myoinositol, 87.642 μ mol/L sucrose and 6.5 g/L agar as a gelling agent (establishment and *in vitro* multiplication phases).

In the *ex vitro* acclimatization phase, the following treatments were evaluated: T₁, mother plants from the field, vigorous and without visible symptoms of viral, fungal or bacterial diseases (as controls); T₂, plants from *in vitro* culture (obtained with AIB, AIA and 6-BAP), the roots of the plantlets were immersed in 0.1 % Ridomil (commercial product Ridomil MZ 72 %, with both, systemic and contact action); T₃, plants obtained *in vitro* with ABr; and T₄, plants obtained *in vitro* with mOLG. The first treatment was not included in the plants cytogenetic study.

Before planting, the roots of plants treated with ABr and mOLG were immersed in 0.2 μ mol/L ABr and 0.47 μ mol/L mOLG solutions in T₃ and T₄, respectively, and 15 days after planting, plants were sprayed with 2 mL of the same concentrations of these growth regulators per vitropiant.

Planting was done on a 70 alveoli (dimensions: 5 × 5 × 5 cm; 125 cm³) polystyrene seed trays containing a substrate made by volume mixture 75 % organic material (decomposed cachaza) plus 25 % of red ferallitic compacted soil. Trays were then transferred to green houses covered with a 30 % mesh polypropylene (photosynthetic photon flux density of 600 μ mol/m²s), under semi-controlled conditions. Irrigation was done by microaspiration, using a Microjet® system (2 kg/cm² and 120 L/h flow rate) with a frequency of 4 watering daily for 2 min each during the first 7 days (control) to achieve a 90 % relative humidity.

Radicular cytogenetic analysis

Roots karyotyping was done from 1 cm-long root tips. These were randomly selected at the beginning (day 0) and at the end (45 days) of the acclimatization phase, as described by Roman and Rodríguez Nodals [25].

Five plants were randomly selected. Chromosomes from 25 cells per plant for each treatment were counted with the use of an optical microscope (Olympus, Japan) with an attached camera (Canon, Japan). The best metaphases were photographed with a 1000× magnification.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Isoenzymic analysis

Extracts preparation for the electrophoretic analysis of carbonic anhydrase (CA), esterases (Est), peroxidases (POX), and polyphenol oxidases (PPO) isozymes was performed according to Roman [26]. Leaves (5 g) were macerated in liquid nitrogen using 0.1 M sodium bicarbonate, pH 7.2, as the extraction buffer.

Samples were then centrifuged at 6000 rpm for 15 min, at 4 °C in a refrigerated Eppendorf centrifuge 5804 R (Eppendorf, Germany). Subsequently, supernatants were filtered through double gauze and were finally packed in 1.5 microcentrifuge tubes mL and stored at -20 °C until use.

Electrophoretic runs for isozyme systems were performed in a discontinuous polyacrylamide gel system [27]. For this purpose, a 10 % Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, separator gel, and a 4 % stacking gel buffer at 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, were used.

The electrophoresis running buffer was 0.025 M Tris, 0.019 M glycine, pH 8.3. The run time was determined by the displacement of the Kolrhauch band to about 6 cm from the starting electrophoresis point. The electrophoresis device was a SE 260 Mini-Vertical (Hoefer®, Pharmacia Biotech, Germany) at a constant current Intensity of 20 mA per electrophoresis run. On each run, extract samples were applied at 15 µL per well.

Once the electrophoretic separation concluded, phytochemical stains were performed specific for each of the evaluated isozyme systems: CA (EC 4.2.1.1) [28], Est (EC 3.1.1.1) [29], POX (EC 1.11.1.7) [30] and PPO (EC 1.10.3.1) [31].

RAPD molecular analysis

The RAPD technique was performed on plant material from five randomly selected treatments. The last leaf of each plant was used at the end of the acclimatization phase, selected by measuring from the base of the pseudostem, and the cigar leaf of field plants with no visible disease symptoms. DNA extraction was performed according to Dellaporta *et al.* [32].

DNA quality was determined by 0.8 % agarose gel electrophoresis in TBE 1× buffer (45 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA, pH 7.0), stained with ethidium bromide (5 mg/mL) and observed in a transilluminator (Bioblock Scientific, France). Final DNA concentration was estimated by measuring the optical density at 260 nm in an Ultraspec Plus Spectrophotometer (Pharmacia LKB, England) spectrometer. The amplification reaction was carried out in 25 µL as final volume containing: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001 % gelatin, 100 µM each dNTP, 5 pmoles of primer (Kits OPA and OPF, Operon Technologies Inc., Alameda, California), 50 ng of genomic DNA and 1 U of Taq DNA polymerase (Promega). Six arbitrary primers were used: OPA-04 (5'-AATCG GGCTG-3'), OPA-10 (5'-GTGATCGCAG-3'), OPA-11 (5'-CAATCGCC GT-3'), OPA-13 (5'-GGCTGCA GAA-3'), OPF-04 (5'-GGTGATCAGG-3') and OPF-13 (5'-GGCTGCA GAA-3') [20, 33].

DNA was amplified using a Progene (Techne, USA) thermocycler programmed for 45 cycles of 1 min at 94 °C, followed by 1 min at 36 °C and 2 min at 72 °C, and one cycle of 10 min at 72 °C. PCR products were electrophoresed in 1.5 % agarose gels in TBE 1× buffer, further stained with ethidium bromide

(5 mg/mL) and visualized in UV transilluminator (Bioblock Scientific, France).

Resulting PCR amplified bands from donor plants and those coming from *in vitro* culture plants were binary evaluated for their presence (1) or absence (0). Results were expressed in percentage of monomorphic bands.

Results and discussion

Radicular cytogenetic analysis

It was verified during the karyotyping studies that the use of ABr and mOLG kept constant chromosome number: $2n = 4x = 44$, in all micropropagation stages of banana clone 'FHIA-18' (AAAB) (Figure 1).

Ploidy variations are not usually evident for more than 20 *in vitro* cultivation cycles for two years by combined cytogenetic and flow cytometry studies. This was evidenced when the number of chromosomes (22) remained constant in banana varieties 'Kluai Sa' (AA) and 'Leb Mue Nang Kluai' (AA) [34].

Chromosomal changes have been observed in *Fragaria* spp. cultured *in vitro*, especially in plants from callus and *in vitro* cells maintained under long term storage [35]. Variations in the ploidy level of *in vitro* culture may result from the relationship between the genetic constitution of the cultured species and culture medium composition [36].

After using the growth regulators mOLG and ABr in all micropropagation stages, no chromosomal mosaics were detected, either $2n = 2x = 22$ chromosomes (diploid) or $2n = 3x = 33$ chromosomes (triploid). These chromosomal mosaics have been described in the accelerated micropropagation clones of *Musa* spp. [37] and cause genetic instability.

Isoenzyme analysis

The isoenzyme study for the evaluated systems using ABr or mOLG showed monomorphic patterns and did

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

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

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

23. Santos MD, Buso GC, Torres AC. Evaluación de genética variabilidad en micropropagados propagules of ornamental pineapple (*Ananas comosus* var. "Bracteatus" (Lindley) Coppins and Leal) using RAPD markers. *Gen Mol Res*. 2008;7(4):1097-105.

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

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

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

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

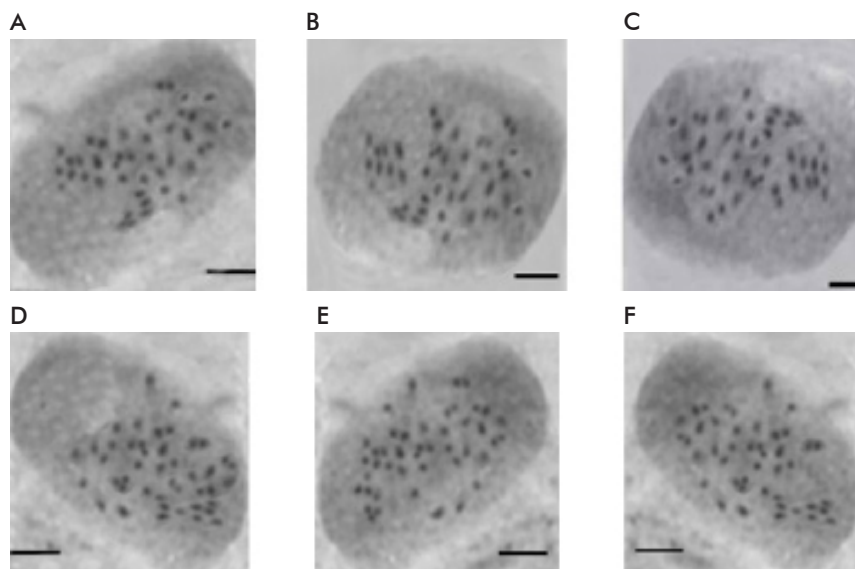


Figure 1. Cells from banana plants (*Musa* spp.) clone 'FHIA-18' (AAAB) in mitotic metaphase in the control treatment (start: A and end: D), under ABr treatment (starting: B and end: E) at all stages and mOLG (star: C and end: F) during acclimatization, with chromosome number $2n = 4x = 44$. The bar represents 25 microns (1000×).

not induce any variations relative to the control plants, suggesting that these growth regulators did not influence the genetic stability of micropropagated materials (Figure 2).

In the CA and PPO systems, eight bands were visualized each. There were six bands for the POX system (bands of the second and sixth genetic system were thicker), and seven in the PPO system. These bands are characteristic of the clone 'FHIA-18' (AAAB), genus *Musa*, characteristics of plants predominantly with an *acuminata* genome [26].

Additionally, Est and PPO isozymes are among the most commonly used for plant species characterization, since they display a high degree of reproducibility and polymorphism, particularly in *Musa* spp. genus cultivars. However, in this study no polymorphism was observed in isozyme systems.

Other authors found complete stability in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) with the POX CA and acid phosphatase isozyme systems [18], obtained from callus and cultured at different concentrations of the brassinosteroids analogues ABr-6 MH-5-6 and Pectimorf-MOLG.

The results obtained for the isozyme systems (CA, Est, POX and PPO) for banana (*Musa* spp.) clone 'FHIA-18' showed no genetic variability, since the 29 analyzed bands were monomorphic, corroborating its correct use to determine the genetic variability and stability on this genus, as some authors have recommended [26]. Furthermore, the results of the cytogenetic study were corroborated.

Molecular analysis using RAPD

From the two analyzed kits, four primers were selected based on the quantity, quality and reproducibility of the amplified bands. The most informative were the OPA-10 and OPF-13 that amplified eight bands each, followed by OPA-04 with seven and OPA-11 with four amplified bands.

These four arbitrary sequence primers amplified 27 bands ranging about 7 bands per primer. All bands matched perfectly with the DNA of the field donor plant previously cultured *in vitro*, and for all the 'FHIA-18' hybrid regenerants obtained after treatment with growth regulators (ABr and mOLG) at all micropropagation stages. The detected bands were 100 % monomorphic, indicating that the use of ABR and the mOLG in all micropropagation phases caused no variation in the hardened plants of this banana genotype.

Molecular studies with RAPD in *Musa* spp. are currently used for variety identification, genetic mapping of useful clones and location of genes conferring resistance to major diseases that affect these crops [19, 33]. In this research, RAPD was used to detect *Musa* spp. somaclonal variants caused by tissue culture. Other groups (for example, Harirah and Khalid [38]) have obtained monomorphic profiles, so concluded that the micropropagation of *Musa acuminata* cv. Berangan from male flowers did not cause somaclonal variation.

The combination of two molecular techniques to study variations generated by *in vitro* culture techniques, allow the evaluation of a greater percentage of genomic loci. In this regard, some researchers have

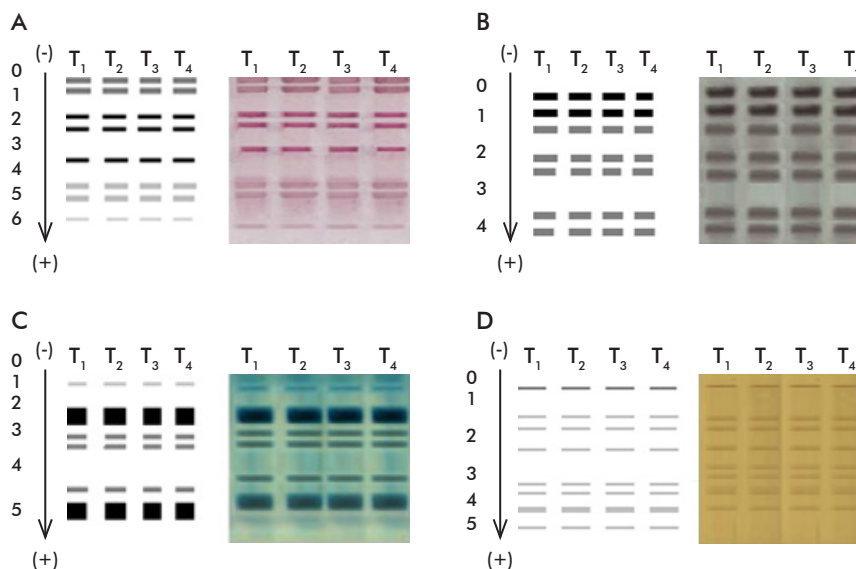


Figure 2. Isoenzymatic evaluation of banana plants (*Musa* spp.) clone 'FHIA-18' (AAAB) obtained with the use of brassinosteroid analogue (ABr) and oligogalacturonides mix (mOLG) by isozyme systems during the acclimatization phase. A) Carbonic anhydrase. B) Esterases. C) Peroxidases. D) polyphenoloxidases. The following treatments were applied: - T1, control of mother plants from field; T2, plants grown *in vitro* - control seedling without dipping the roots for 15 min before planting (I) or no foliar spray during 15 days after planting (AF); T3: plants obtained *in vitro* with ABr (0.2 μ mol/L) and I + AF; T4, plants obtained *in vitro* with immersion + mOLG (0.47 μ mol/L) AF.

described the use of RAPD markers and intersimple sequence repeats (ISSR) to examine genetic variation in plants of banana (*Musa* spp. var. 'Nanjanagudu Rasabale' AA) micropropagated for 10 years [20]. They obtained uniform band patterns, and samples were devoid of polymorphic bands in spite that morphologically different plants were included.

However, other authors have found a high polymorphism in regenerants from *in vitro* culture with the single use of RAPD in *Musa* spp. [19]. Also, a high percentage of monomorphism or complete genetic stability has also been described on crops such as *Ipomoea batatas* (L.) Lam. clone 'INIVITB 93-1' [22], *Ananas comosus* var. 'Bracteatus' (Lindley) Coppens and Leal [23], and *Centaurea ulreiae* Silva Pando [39]. Also with this technique, a high rate of polymorphism (93.19 %) in medicinal plants has been reported [40].

Results with RAPD molecular markers for the analyzed primer combinations indicated no intra- or inter-population genetic variation in the four studied populations of 'FHIA-18' banana plants, regardless its origin (mother plants from the field, cultured *in vitro* with AIB, AIA and 6-BAP, or generated *in vitro* and treated *ex vitro* with ABR or mOLG, respectively).

Conclusions

The genetic stability of banana (*Musa* spp.) 'FHIA-18' was corroborated in regenerant clones after using ABR and mOLG during the *in vitro* and *ex vitro* plant propagation. It was confirmed that the chromosome number of the specie remained constant and they were stable, as determined by the cytogenetic, isozymes and RAPD techniques. This was verified by the identical band patterns displayed by progenitor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

plants, and those obtained by both, plants grown *in vitro* with traditional or modern growth regulators. The study validated the use of ABr and mOLG for micropropagation in this clone.

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

38. Harirah AA, Khalid N. Direct regeneration and RAPD Assessment of male inflorescence derived plants of *Musa acuminata* cv.

Berangan. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*. 2006;14(1):11-7.

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

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

Received in June, 2013.

Accepted in October, 2013.