

CARACTERIZACIÓN DE ACCESIONES PERTENECIENTES A LAS COLECCIONES DE LOS GÉNEROS *MUSA* E *IPOMOEA* MEDIANTE MARCADORES GENÉTICOS.

María Isabel Román¹, Lianet González¹, Alianny Rodríguez², Marlyn Valdés².

RESUMEN

Los plátanos, bananos y boniatos son cultivos de subsistencia en diferentes partes del mundo y son reconocidos como alimentos básicos en la dieta de esas regiones. En Cuba su cultivo es fundamental para lograr un equilibrio de productos en el mercado de ahí que el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) sea el encargado por el Ministerio de la Agricultura del mantenimiento, conservación y explotación de las colecciones de los géneros *Musa* e *Ipomoea*, las que pueden ser utilizadas por investigadores, mejoradores y productores. Teniendo en cuenta esta situación nos planteamos el siguiente objetivo: caracterizar accesiones de las colecciones de los géneros *Musa* e *Ipomoea* mediante análisis citogenéticos y genético-bioquímicos para conocer el grado de variabilidad genética y propiciar un eficiente manejo de estos bancos de germoplasma. En el análisis citogenético se determinaron diferentes niveles de ploidía (diploides, triploides y tetraploides para las accesiones de *Musa* y hexaploide para las accesiones de *Ipomoea*). En el análisis cuantitativo de los electroforetogramas, a partir del estudio genético-bioquímico, se observó en las accesiones del género *Musa* que de un total de 73 bandas analizadas se observó un 98.63% de polimorfismo y para las accesiones del género *Ipomoea*, de un total de 39 bandas analizadas, resultaron ser polimórficas el 71,79%. El elevado polimorfismo encontrado entre las accesiones analizadas puso de manifiesto una alta heterogeneidad entre las mismas, que resultaron ser representativas de la diversidad genética del material que se conserva en estos bancos de germoplasma.

Palabras claves: cromosomas, ploidía, isoenzimas, polimorfismo.

¹ Instituto Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. roman@fbio.uh.cu

² Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 # 455, et J e I, Ciudad de la Habana, Cuba.

Characterization of accessions belonging to the collections of genus *Musa* and *Ipomoea* by means of genetic markers.

ABSTRACT

Bananas, plantains and sweet potatoes are subsistence farming in different parts of the world, where they are considered the basic food in these regions' diet. In Cuba its cultivation is essential to achieve the balance of products on the market. Therefore, the Research Institute in Tropical Viands (INIVIT) is, within the Ministry of Agriculture, the entity in charge of the maintenance, conservation and exploitation of the collections of the genus *Musa* and *Ipomoea*, which can be used by scientific researchers and producers. Taking into account this situation, we come upon the following objective: to characterize accessions of the collections of the genus *Musa* and *Ipomoea* through cytogenetic and genetic-biochemical analyses in order to know the degree of genetic variability and to bring about an efficient management of such germoplasm banks. In the cytogenetics analysis there were determined different levels of ploidy (diploids, triploids and tetraploids for *Musa* accessions, and hexaploid for *Ipomoea* accessions). In the quantitative analysis of the electrophoretograms, from the genetic-biochemical study, it was observed in the accessions of genus *Musa* that out of 73 analyzed bands a 98.63% of polymorphism was detected, and for the genus *Ipomoea* accessions, from a total of 39 analyzed bands, the 71.79% turned out to be polymorphic. The high polymorphism found among the analyzed accessions revealed a large heterogeneity between them; furthermore, the accessions were representative of the genetic diversity of the material which is preserved in these germoplasm banks.

Keywords: Chromosomes ploidy, isozyme, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos comprenden la variabilidad presente y potencialmente útil para el futuro de la humanidad, ya que constituyen la suma de todas las combinaciones de genes resultantes de

la evolución de las especies, lograda como consecuencia de la interacción de dichos genotipos con el medio ambiente, generándose por esta vía un gran número de individuos adaptados a las diferentes condiciones locales y así

lograr que se incremente su diversidad genética (IPGRI- Cornell University, 2003).

La evaluación y caracterización de la variabilidad existente en las colecciones constituyen actividades prioritarias en el sistema de manejo de los bancos de germoplasma. La información sobre el potencial fenotípico y genotípico de las accesiones brinda a los mejoradores el soporte necesario para la selección adecuada de los progenitores en los programas de mejoramiento genético, así como para hacer un uso racional de dicho material (Frankham et al., 2003).

El estudio de diversidad genética permite definir patrones de variabilidad dentro de las colecciones, grupo de accesiones con características comunes, caracteres más significativos y otros elementos que posibilitan ordenar la información obtenida y establecer las líneas de acción necesarias para una conservación y aprovechamiento más eficaz de los recursos (Tapia et al., 2005)

Teniendo en cuenta los aspectos antes expuestos nos planteamos el siguiente objetivo: Caracterizar la variabilidad genética mediante marcadores genéticos en accesiones de las colecciones de los

géneros *Musa* e *Ipomoea* combinando análisis citogenéticos y genético-bioquímicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se estudiaron dos especies y 25 cultivares pertenecientes a la colección cubana de bananos y plátanos (*Musa* spp.), y 14 cultivares procedentes de la colección cubana de boniatos (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Los que provienen de colectas realizadas en el territorio nacional, introducciones al país, clones comerciales, resultado de métodos biotecnológicos y producto de los programas de mejoramiento genético en los cultivos.

El material fue plantado de acuerdo a un Diseño Completamente Aleatorizado en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), de Santo Domingo, Villa Clara:

Colección cubana de bananos y plátanos (*Musa* spp)

Musa acuminata, *Musa balbisiana*, 'Paka', 'SH-3362', 'SH-3142', 'BB de Viet Nam', 'Mundo', 'Cavendish gigante', 'Cavendish enano', 'Parecido al rey', 'Gran enano', 'Americani', 'FHIA-01', 'FHIA-18', 'FHIA-23', 'SH3436', 'SH3436 L-9', 'Burro CEMSA', 'Saba',

Somaclon de Saba', 'Pelipita', 'Burro criollo', 'FHIA-211', 'Hembra ¾', 'Macho ¾', 'Z-30'.

Colección cubana de boniatos (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)

'CEMSA-78-354', 'IB-90-2', 'IB-93-1', 'CEMSA-74-228', 'CEMSA-78-326', 'IBS-2005-3', 'IB-2-2005', 'IB-88', 'IB-90-416', 'IB-98-3', 'Yabú-8', 'Pastor Venereo', 'Avileño-3', 'Avileño-4'.

En el análisis citogenético el nivel de ploidía se determinó por el conteo de cromosomas en las especies y cultivares de bananos, plátanos y boniatos. Se tomaron raíces de un centímetro de longitud procedentes de la germinación de los cormos para los bananos y plátanos y en los cultivares de boniatos las raíces se obtuvieron de la germinación de los tubérculos. Las raíces en ambos cultivos fueron pre-tratadas con una solución de 8-hidroxiquinolina al 0.02% durante tres horas, luego lavadas con agua destilada y fijadas en una solución de etanol-acético (3:1).

Se realizaron modificaciones en los métodos de tinción de la siguiente forma: las raíces se hidrolizaron en ácido clorhídrico 1N a 60°C durante 12 minutos para el género *Musa*, 14 minutos para el género *Ipomoea*. Posteriormente se

procedió a la tinción con hematoxilina lacacromica durante dos horas a 60°C para los dos géneros.

A continuación, los ápices fueron colocados en portaobjetos con ácido acético al 45% para la realización del aplastamiento (*squash*). El conteo del número cromosómico se realizó en 30 células procedentes de las raíces de cada material, se empleó un microscopio óptico (Ortholux Leitz), con cámara fotográfica acoplada (Orthomat Leitz). Las metafases fueron fotografiadas, con un objetivo de 100X y la lente de la cámara con un ocular de 10X.

Los análisis electroforéticos se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% y un sistema de buffer discontinuos, para los sistemas isoenzimáticos peroxidasas, polifenoloxidasas, esterasas y anhidrasa carbónica, utilizando extractos foliares, de los diferentes cultivos, según Román, (2004).

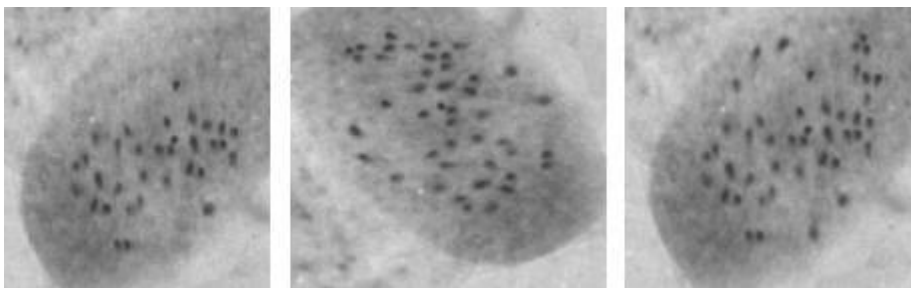
Se establecieron los fenotipos isoenzimáticos de cada cultivar y especie sobre la base del número y posición de cada banda. Se determinó el número de bandas totales, el número de bandas polimórficas y el porcentaje de polimorfismo, así como el número de

zimotipos, el de zimotipos propios y el porcentaje que representan los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis citogenético se determinaron los diferentes niveles de ploidía para el género *Musa* con la presencia de ($2n=2x=22$; $2n=3x=33$; $2n=4x=44$) cromosomas, correspondiéndose con los cultivares diploides, triploides y tetraploides respectivamente (Figura 1).

Las dos especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* mantienen la condición de diploides y para los cultivares de bananos se encontraron los tres niveles de ploidía mientras que para los plátanos se encontraron cultivares triploides y tetraploides. Resultados similares fueron obtenidos por Osuji, et al.; (2006) en estudios realizados al emplear los análisis citogenéticos y específicamente el conteo del número cromosómico para identificar cultivares del género *Musa* pertenecientes a diferentes grupos genómicos.



$2n = 2x = 22$

$2n = 3x = 33$

$2n = 4x = 44$

Figura. 1: Células en metafases mitóticas con $2n=2x=22$, $2n=3x=33$ y $2n=4x=44$ cromosomas de especies y cultivares de bananos y plátanos (*Musa* spp.)

Para los cultivares pertenecientes al género *Ipomoea* se comprobó la condición de hexaploide con $2n=6x=90$ cromosomas (Figura 2), en todas las accesiones analizadas, por lo que se comprueba que en este cultivo el número de cromosomas se mantiene estable.

Este resultado es muy importante para la colección de trabajo ya que varios cultivares fueron obtenidos en los programas de mejoramiento genético del cultivo y no se conocía exactamente si había ocurrido una variación en su número de cromosomas. Estos resultados en los dos géneros

permitieron dilucidar la situación taxonómica de algunas accesiones para su caracterización y realizar la ubicación correcta en los grupos genómicos respectivos, así como completar la información de los datos de pasaporte de las mismas. Valdés *et al.*; (2010) en accesiones del género *Nicotiana*, obtuvo resultados similares que también le permitieron completar los datos de pasaportes en dicha colección. El estudio genético-bioquímico en la colección del género *Musa* permitió detectar una alta heterogeneidad entre las accesiones

El estudio genético-bioquímico en la colección del género *Musa* permitió detectar una alta heterogeneidad entre las accesiones estudiadas, lo que puso de manifiesto la variabilidad genética del material analizado (Tabla 1). De un total de 73 bandas analizadas solo una resultó común a todo el material para un 98.63% de polimorfismo. Los sistemas isoenzimáticos peroxidasa, esterasa y anhidrasa carbónica fueron los más polimórficos con un 100% de polimorfismo. Todas las accesiones se lograron diferenciar al mostrar zimotipos propios, por lo que se pudo detectar que no existían cultivares duplicados en esta

estudiadas, lo que puso de manifiesto la variabilidad genética del material analizado (Tabla 1).

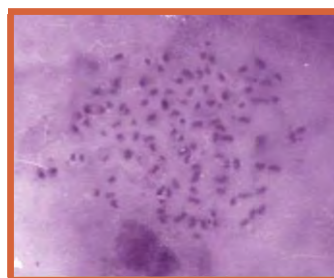


Figura. 2: Células en metafase mitótica con $2n=6x=90$ cromosomas en cultivares de boniatos (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.).

colección de trabajo, con este resultado también se comprueba que se cuenta con una buena representación de los cultivares pertenecientes a los diferentes subgrupos del género.

En el análisis se muestran 92 zimotipos para todos los sistemas analizados con 83 zimotipos propios, lo que representa un 90.21% de zimotipos propios que identifican a los cultivares de la colección de trabajo. A pesar que algunos cultivares comparten zimotipos similares en algunos sistemas isoenzimáticos se detecta en otros diferencias significativas.

Tabla 1. Análisis cuantitativo de los zimogramas para los sistemas isoenzimáticos analizados en las especies y cultivares de bananos y plátanos (*Musa* spp.).

Sistemas electroforéticos	Total de bandas	Total de bandas polimórficas	% de polimorfismo	Total de zimotipos	No. de zimotipos propios	% de zimotipos propios
Peroxidasas	18	18	100.0	13	6	46.15
Polifenoloxidasas	16	15	93.75	26	25	96.15
Esterasas	24	24	100.0	27	27	100
Anhidrasa carbónica	15	15	100.0	26	25	96.15
Total	73	72	98.63	92	83	90.21

Un ejemplo es en el sistema peroxidasas que fue donde se presentó el valor más bajo de zimotipos propios y es que este sistema está muy relacionado con la identificación de los cultivares y su grupo genómico, lo que permitió diferenciarlos en grupos: bananos diploides, triploides y tetraploides y para los plátanos se diferenciaron los cultivares que pertenecen al subgrupo ABB y los AAB. Este resultado se corroboró con el empleo del resto de los sistemas analizados, lo que demostró las posibilidades de la aplicación de estas técnicas de forma combinada para el manejo eficiente de la colección de *Musa*. En el estudio de otras colecciones de trabajo en el género *Román*, *et al* (2014) lograron resultados similares al emplear los marcadores de proteínas.

En la colección de trabajo para los cultivares de boniato se observa el análisis cuantitativo de los zimogramas en la tabla 2, de un total de 39 bandas analizadas solo 11 resultaron comunes a todo el material para un 71.79% de polimorfismo. Este resultado es debido a la presencia de un grupo de cultivares que proceden del programa de mejoramiento genético en el cultivo y algunos comparten progenitores. El sistema isoenzimático esterasas fue el más polimórfico con un 100% de polimorfismo.

Sin embargo todas las accesiones se lograron diferenciar con un total de 39 zimotipos para todos los sistemas analizados, de estos se presentaron 29 zimotipos propios distribuidos en todos los sistemas para un 74.35% de

zimotipos propios. El sistema que mostró más zimotipos propios fue el sistema isoenzimático esterasas que se corresponde con el sistema 100% polimórfico, este resultado coincide también con el obtenido para la colección de trabajo del género *Musa*.

El cultivar 'CEMSA-74-228', fue el que presentó el mayor número de zimotipos propios y a continuación se ubica el cultivar 'IB-98-3', Los cultivares 'CEMSA-78-326', 'IBS-2005-3', 'IB-88',

'IB-90-416', 'Pastor Venéreo' y 'Avileño-4', mostraron el mismo valor de zimotipos propios para los sistemas analizados y se pudo identificar a cada cultivar como accesiones diferentes. Lo mismo sucedió para los cultivares CEMSA-78-354', 'IB-90-2', 'IB-93-1', 'IB-2005-2', 'Yabú-8' que presentaron zimotipos que los caracterizan como cultivares diferentes a pesar que comparten bandas comunes y el cultivar 'Avileño-3' fue el que mostró el menor número de zimotipos propios.

Tabla 2. Análisis cuantitativo de los zimogramas para los sistemas isoenzimáticos analizados en los cultivares de boniatos (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.).

Sistemas electroforéticos	Total de bandas	Total de bandas polimórficas	% de polimorfismo	Total de zimotipos	No. de zimotipos propios	% de zimotipos propios
Peroxidasas	9	4	44,4	8	5	62,5
Polifenoloxidasas	8	3	37,5	6	2	33,3
Esterasas	13	13	100	14	14	100
Anhidrasa carbónica	9	8	88,8	11	8	72,7
Total	39	28	71.79	39	29	74.35

Los resultados obtenidos con el porcentaje de polimorfismo detectado en los cultivares analizados están en correspondencia con la variabilidad genética presente en estas colecciones de trabajo, lo que confirma que al realizar

estos análisis de conjunto (el conteo de cromosomas y los análisis genético:- bioquímicos) son considerados como marcadores muy útiles para conocer la diversidad presente en los bancos de germoplasmas de estos cultivos.

Resultados similares fueron obtenidos por Valdés *et al.*, (2010) al analizar especies silvestres en el género *Nicotiana*.

CONCLUSIONES

- El análisis citogenético permitió determinar el número de cromosomas de las especies y cultivares analizados pertenecientes a las colecciones de los géneros *Musa* e *Ipomoea*.
- Los sistemas de marcadores genético-bioquímicos resultaron eficientes para evaluar la variabilidad genética de las accesiones de las colecciones de trabajo y las bandas diferenciales detectaron los zimotipos propios entre las mismas donde se comprobó que no existen duplicados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Frankham, R.; Ballou, J.D. y Briscoe, D.A. (2003). Introduction to conservation genetics. Cambridge Univ. Press Cambridge UK. 100pp.
- IPGRI-Conell University, (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética en plantas: Módulo de aprendizaje, 89pp.
- Osuji, J. O.; Okoli, B. E.; Edeoga, H. O. (2006). Karyotypes of the A and B Genomes of *Musa* L. *Cytologia*. 71(1): 21-24.
- Román, M. I. (2004). Estudio de la diversidad genética en accesiones de bananas y plátanos (*Musa* spp) en Cuba. Tesis de doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. 127pp.
- Román, M. I.; González, L.; Valdés, M. (2014). Evaluation of the genetic diversity in the collections *ex situ* in the genus *Musa*. ISBN 978-959-250-973-3. Agrocentro-2014.
- Tapia, E.; Gutiérrez, M.A.; Warburton, M.; Santacruz, A. y Villegas, A. (2005). Characterization of mandarin (*Citrus* spp) using morphological and AFLP markers. *INCI* 30(11):1-23.
- Valdés, M.; González C.; Lara, R. M.; Román, M. I.; Hernández, Y.; Hernández, R. M.; Cabrera, M., Torrecilla, G.. (2010). Diversidad genética de especies silvestres del género *Nicotiana* I: Caracterización mediante marcadores bioquímicos. *Protección Vegetal*. 25, 2, 88-97
- Valdés, M.; Xiqués, X.; Hernández, Y.; Rojas, A.; Román, M. I.; Cabrera, M.; Torrecilla, G. (2010). Marcadores citogenéticos en especies del género *Nicotiana*. *Revista Cuba Tabaco*. 11(2):17-23.