



Gobierno
Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la **Agricultura y Tierras**

Instituto Nacional de **Investigaciones Agrícolas**

omía
Tropical

Agronomía
Tropical

Agronomía
Tropical

Agronomía
Tropical

**Agronomía
Tropical**

Depósito Legal: pp. 195102AR73
ISSN: 0002 - 192X
AÑO 62 VOL. 64 No.3-4 2014



ISSN : 002 - 192X
Depósito Legal pp. 195102AR73

AGRONOMÍA TROPICAL es publicada por el INIA de la República Bolivariana de Venezuela para la socialización del conocimiento científico y humanístico, en los diferentes componentes de los sistemas de producción agrícola vegetal que garanticen la producción de alimentos y temas que contribuyan con la sustentabilidad de los sistemas agro productivos.

Miembros Fundadores

Luis Medina (Dir.)
Bruno Mazzani
Wasily Iljin
Rafael Pontis Videla
Jesús Silva Calvo
Gino Malagutti
Giuseppe Ravanello
Luis A. Salas F.
Salomón Horovitz
Pedro Obregón
Dora Micheletti de Zerpa

Comité Editorial

Delis Pérez	Editora Jefe
Grigna Piña	Editor Técnico
Andreina Muñoz	Editora Asistente
Zulay Melo	Seguimiento
Carmen Solórzano	Diagramadora

Editada por la Gerencia de Investigación e Innovación Tecnológica
Coordinación Área de Gestión de la Información.
Impresa en el Taller de Artes Gráficas del INIA.
Tiraje: 300 ejemplares

Unidad de Distribución y Venta de Publicaciones.
INIA. Apdo. postal 2105, Maracay 2101.
Estado Aragua, Venezuela.
Precio Bs. 350,00

Correo electrónico: dyvpublicaciones@inia.gob.ve

La revista *Agronomía Tropical* está disponible en la red de biblioteca INIA. Se puede acceder a la versión digital por internet a través de nuestro sitio web: <https://www.inia.gob.ve>
área publicaciones

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas

Juan Pablo Buenaño	Presidente
Luis Dickson	Gerente General
Delis Pérez Sánchez	Gerente de Investigación e Innovación Tecnológica
Yenry Urrea	Gerente de Producción Social
María F. Sandoval	Gerente de Participación y Desarrollo Comunitario

Editores Asociados

Oscar Abarca (ACAV)	Recursos de Aguas y Tierras
Aída Ortiz (UCV)	Cereales, Malezas y Semillas
Delis Pérez (INIA)	Mejoramiento Genético de Plantas
Marjorie Cásares (UCV)	Desarrollo Rural
Lorenzo Velásquez (INIA)	Fertilidad y Manejo de Suelos
Marco Acevedo (INIA)	Mejoramiento Genético de Plantas

Consejo Asesor

Juan Vergara	INIA Zulia, Venezuela
Antonio de la Casa	UNC, Argentina
Pedro Morales	INIA CENIAP, Venezuela
Graciela Vergara	UNLPam, Argentina
Ezequiel Alonzo	INIA CENIAP, Venezuela
Emma Ramírez	INIA Táchira, Venezuela
Pedro Monasterio	INIA Yaracuy, Venezuela
Beatriz Graterol	INIA Amazonas, Venezuela
Grigna Piña	INIA CENIAP, Venezuela

Indización

CAB Internacional	(Reino Unido)
TROPAG	(Holanda)
AGRIS, FAO	(Roma)
IICA-CIDIA	(Costa Rica)
REVENCYT	(Venezuela)
REFERATIVNY ZHURNAL	(Rusia)
Base Agrícola	
Venezolana, INIA	(Venezuela)
Periódica UNAM	(México)
Fundacite Mérida	(Venezuela)
BIOSIS Zoological Record	(Reino Unido)
Centro de Información y Documentación	(Cuba)
AGRICOLA, National	
Agricultural Library	(USA)
LATINDEX	(México)
MegaBase AGRI 2000	(Venezuela)
Base de Datos REVIS	(CATIE, Costa Rica)
SciELO	(Venezuela)

Se acepta el intercambio con otras revistas

Exchange requested	Wir bitten um austausch
On demance l' échange	Gradiremmo cambio

Deseamos permuta

AGRONOMÍA TROPICAL

Agronomía Trop.

**Revista trimestral del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas,
Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras
Maracay, Venezuela**

Agradecimientos

Los miembros del Comité Editorial de la revista *Agronomía Tropical* desean expresar públicamente su agradecimiento, a las personas abajo mencionadas, por su valiosa colaboración en la revisión de los artículos científicos que conforman el Volumen 64 del año 2014.

Ada Mureen Medina. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Adolfo Cañizares. INIA. Edo. Monagas.
Adriana Pardo. UCLA. Edo. Lara.
Ariadne Vegas. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Alexis Bermúdez. ULA. Edo. Trujillo.
Andy Díaz. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Atilio Higuera. Universidad del Zulia. Edo. Zulia
Auris Damely García. UCV-FAGRO. Edo. Maracay.
Barbara Gutierrez. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Carlos Marín. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Catalina Ramis. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Claret Michelangeli. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Delia Polanco. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Efraín Salazar. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Emma Rueda. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Enio Soto. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Erika Arnao. Southern Illinois University. Illinois. USA
German Torrealba. INIA. Edo. Lara.
Giomar Blanco. INIA. Edo. Yaracuy.
Grigna Piña. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Hilda Fernández. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Hilmig Viloria. UDO. Edo. Monagas.
Iris Pérez. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Joan Montilla. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Jorman Rodríguez. INIA. Edo. Lara.
José Albarran. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Juan Vergara. INIA. Edo. Zulia.
Luis Angulo. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Luis Vivas. INIA. Edo. Guárico.
María Morros. INIA. Edo. Lara.
María Navas. INIA. Edo. Barinas.
María Ormeño. INIA. Edo. Mérida.
María Sánchez. UDO. Edo. Monagas.
Marco Acevedo. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Margaret Gutiérrez. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Marilu Chirinos. UCLA. Edo. Lara.
Martha Osorio. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Miguel Ramón. INIA. Edo. Portuguesa.
Morela Fuchs. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Olga Móvil. INIA. Edo. Miranda.
Oralys León. INIA CENIAP. Edo. Aragua.
Paola Artioli. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Paol Garzón. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Petra Madriz. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Reinaldo Cardona. INIA. Edo. Portuguesa.
Rosalía Velásquez. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Rossmary Castañeda. INIA. Edo. Lara.
Tibayde Sánchez. UCV-FAGRO. Edo. Aragua.
Yanely Alfaro. INIA CENIAP. Edo. Aragua.

De igual manera agradecemos a los investigadores que enviaron sus artículos y se invita a la comunidad científica, especialista en los diferentes componentes de producción en el área de las ciencias agrícolas, a continuar consignando sus trabajos en nuestra revista. Finalmente, extendemos nuestro reconocimiento a los investigadores Alfredo Romero y Efraín Salazar por su importante participación en la revisión de los abstract, y a Sonia Piña, por su apoyo técnico en la edición de las imágenes publicadas para este volumen.

TABLA DE CONTENIDO Vol. 64 N° 3-4

Artículos Científicos

Castañeda R., Ramis C. y Pérez D. Asociación entre marcadores microsatélites y el gen de resistencia a la bacteriosis común en familias F2:4 de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	133
Pardo Roldán A. A., Cabrera Osechas G. A. y Hernández N. J. Evaluación de condiciones de almacenamiento y crecimiento de microbulbos de ajo provenientes de cultivo <i>in vitro</i>	143
Bedoya Gómez A. M., Ramis Jaime C. M., Angulo Graterol L. R., De Faria Muñoz Y. K. y Burgos Pérez A. R. Método de extracción de la pectina metilesterasa (EC 3.1.1.11) en frutos de níspero	155
Briceño Cárdenas R., De Sousa Vieira D., Díaz A., Rea R., Niño M., Rivero A., Aza G. y George J. R. Evaluación de clones experimentales de caña de azúcar en etapas tempranas del programa venezolano para el desarrollo de variedades.....	165
Blanco Espinoza G. G., Linares B. A., Guédez Falconete R. P., Hernández Fermín J. B. y Rincón C. A. Efecto de diferentes dosis de extractos de plátano sobre el crecimiento de plantas <i>in vitro</i> del mismo cultivo en aclimatización	173
Salazar E., Trujillo I., Castro L., Vallejo E. y Torrealba M. Radiaciones ionizantes para inducción de mutaciones en <i>Musa</i> AAA para la tolerancia a sequía.....	185
Pérez Chacín O. G.; Trujillo Díaz I. E. y Fuchs Delgado M. M. Contenido de fenoles en clones de musáceas ‘Pineo Gigante’ y ‘Cambur Manzano’.....	201
Torrealba-Núñez G. T., Pérez – Almeida I., Ramis C., Delgado N., Angulo L., De Faria Y. K., Marín C., León Brito O. C. y Martínez Zapata G. C. Marcadores bioquímicos y moleculares asociados a la tolerancia al estrés hídrico en arroz	211
Roa S., Fernández H., Castro L. y Useche N. Diversidad genética de especies de <i>Rubus</i> determinada mediante RAPD	227
González Pérez L., Osorio Delgado M. y Suarez F. Caracterización morfoagronómica de variedades de papas nativas y de uso local colectadas en el estado Mérida, Venezuela	227
Instrucciones al autor	253

TABLE OF CONTENTS Vol. 64 N° 3-4

Scientific Articles

Castañeda R., Ramis C. and Pérez D. Association between microsatellite markers and the resistance gene to common bacterial blight in F2:4 families of <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	133
Pardo Roldán A. A., Cabrera Osechas G. A. and Hernández N. J. Evaluation of storage conditions and growth in greenhouse of microbulbs of garlic from tissue culture	143
Bedoya Gómez A. M., Ramis Jaime C. M., Angulo Graterol L. R., De Faria Muñoz Y. K. and Burgos Pérez A. R. Design extraction method pectin methylesterase (EC 3.1.1.11) in sapodilla fruit.....	155
Briceño Cárdenas R., De Sousa Vieira D., Díaz A., Rea R., Niño M., Rivero A., Aza G. and George J. R. Sugarcane clones evaluation at early stages Venezuelan variety development	165
Blanco Espinoza G. G., Linares B. A., Guédez Falconete R. P., Hernández Fermín J. B. and Rincón C. A. Effect of different doses of plantain extracts on the growth of <i>in vitro</i> plantlets in acclimatization of the same crop.....	173
Salazar E., Trujillo I., Castro L., Vallejo E. y Torrealba M. Ionizing radiation for mutation induction in <i>Musa</i> AAA for drought tolerance	185
Pérez Chacín O. G.; Trujillo Díaz I. E. and Fuchs Delgado M. M. Phenol content in 'Pineo Gigante' and 'Cambur Manzano' musaceae clones	201
Torrealba-Núñez G. T., Pérez – Almeida I., Ramis C., Delgado N., Angulo L., De Faria Y. K., Marín C., León Brito O. C. and Martínez Zapata G. C. Biochemists and molecular markers associated with water stress tolerance in rice	211
Roa S., Fernández H., Castro L. and Useche N. Genetic diversity of <i>Rubus</i> species determined by RAPD.....	227
González Pérez L., Osorio Delgado M. and Suarez F. Morpho-agronomic characterization of native and local potato varieties collected in Mérida state, Venezuela	227
Instructions to the author	253

Asociación entre marcadores microsatélites y el gen de resistencia a la bacteriosis común en familias $F_{2:4}$ de *Phaseolus vulgaris* L.

Association between microsatellite markers and the resistance gene to common bacterial blight in $F_{2:4}$ families of *Phaseolus vulgaris* L.

Rossmory Castañeda^{1*}, Catalina Ramis² y Delis Pérez¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal (INIA Lara) y Banco de Germoplasma Leguminosas (INIA-CENIAP). ²Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Genética. *Correo electrónico: rosmarych@gmail.com.

RESUMEN

La incidencia de enfermedades es uno de los factores que limita la producción de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). La bacteriosis común de la caraota causada por *Xanthomonas phaseoli* (*Xph*) es la enfermedad bacteriana más importante del cultivo, reduce la producción de grano en un 45% y también afecta la calidad de la semilla. Es necesario incorporar genes de resistencia a través de programas de cruzamientos. El objetivo del presente trabajo fue verificar la asociación entre marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR) y el gen de resistencia a la bacteriosis común en familias $F_{2:4}$ de caraota. La evaluación molecular se realizó mediante la amplificación de cebadores PV-ctt001, PV-atgc001, BM-140, BM-156 y BM-202 que mostraron posible asociación con el carácter resistencia. Para la amplificación de SSR se utilizaron las condiciones estandarizadas en el Laboratorio de Genética Molecular, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Se contrastó la segregación esperada de la población $F_{2:4}$ para cada SSR con el programa MapDisto Genetics V 6.3. BM-140, el cual se comportó como marcador monomórfico y no fue posible diferenciar entre familias resistentes a *Xph* y PV-atgc001 como un locus independiente. Existió asociación entre los SSR: BM-156, BM-202 y PV-ctt001 y el gen mayor de resistencia en las familias $F_{2:4}$. La selección asistida hacia el alelo "b" utilizando esos SSR será de gran utilidad para identificar plantas portadoras de la resistencia, y darle continuidad al programa de mejoramiento genético.

Palabras clave: *Xanthomonas phaseoli*, marcadores genéticos, mejoramiento genético, caraota.

ABSTRACT

The incidence of disease is one of the factors limiting the production of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The common bacterial blight of bean caused by *Xanthomonas phaseoli* (*Xph*) is the most important crop bacterial disease because reduces grain yield by 45% and also affects the quality of the seed. It is necessary to incorporate resistance genes through crossing programs. The object of this study was to verify the association between type microsatellite molecular markers (SSR) and the resistance gene to common bacterial blight in families $F_{2:4}$ of black bean. The molecular evaluation was performed using the amplification primers PV-ctt001, PV-atgc001, BM-140, BM-156 and BM-202, that has previously showed a possible association with resistance. For amplification of SSR, the standardized conditions in the Molecular Genetics Laboratory Agronomy Faculty, Central University of Venezuela were used. Expected segregation of $F_{2:4}$ families for each SSR was verified using MapDisto Genetics V 6.3 program. BM-140 behaved as a monomorphic marker and PV-atgc001 as an independent locus, so it was not possible to differentiate between resistant families using these markers. Significant association between SSR: BM-156, BM-202 and PV-ctt001, and resistance controlled by a dominant gene in families $F_{2:4}$ was found. Assisted selection to the "b" allele using these SSR will be useful to identify plants carrying the resistance in black bean breeding programs.

Key words: *Xanthomonas phaseoli*, genetic markers, plant breeding, black bean.

INTRODUCCIÓN

La caraota (*Phaseolus vulgaris* L.), constituye la leguminosa de grano de mayor consumo en Venezuela. Representa uno de los alimentos básicos en la dieta del venezolano y es la principal fuente de proteína vegetal (Mekbib, 2003; Mwale *et al.*, 2008).

Sin embargo, la incidencia de enfermedades es uno de los factores que limita la producción de este cultivo; siendo la bacteriosis común de la caraota, causada por *Xanthomonas phaseoli* (*Xph*), la enfermedad bacteriana más importante (Maselli *et al.*, 2006) y una de las principales causas de los bajos rendimientos, lo que reduce la producción del grano hasta en un 45% y afectando además, la calidad de la semilla (Cruz *et al.*, 2001; Mutlu *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2008).

La resistencia genética se presenta como la alternativa de control económicamente efectiva y ecológicamente sustentable (Yu *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2004), especialmente cuando se combina con prácticas de cultivo que previenen el establecimiento de patógenos en el campo (Santos *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2008).

Ante tal contexto, los marcadores moleculares asociados a genes de resistencia son una herramienta útil para la evaluación y selección de plantas. El primer paso de un programa de mejoramiento, mediante la selección asistida por marcadores moleculares (SAM), es la identificación de los marcadores de las regiones del genoma asociadas a tal resistencia.

Los genes que condicionan la resistencia a determinados aislamientos de *Xph* han sido reconocidos al emplear marcadores moleculares (Nodari *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1994; Miklas *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1997; Lagarde *et al.*, 2010). Estos genes han logrado explicar y son responsables, en forma individual, del 18 al 53% de la variación fenotípica del carácter bajo estudio. Cuando se analizan en grupos de dos, estos valores oscilan entre 46 y 65%, mientras que en conjunto alcanzan hasta aproximadamente el 75% (Nodari *et al.*, 1993; Miklas *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1997; Salomón, 2002; Lagarde *et al.*, 2010).

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) son regiones de secuencias pequeñas

(2 a 10 pares de bases) repetidas y arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas al azar por todo el ADN. Se caracterizan por su hipervariabilidad, abundancia, reproducibilidad, herencia mendeliana simple, son multialélicos de naturaleza codominante y genomas eucariotas (Yu *et al.*, 2000; Gaitán *et al.*, 2002).

En este proceso, es importante la identificación de marcadores moleculares tipo SSRs asociados a la resistencia a *Xph*, ya que, permitirán a los programas de mejoramiento iniciados, la obtención de cultivares de caraota mejorados para tal característica, con mayor eficiencia y eficacia.

Por tanto, en un programa de mejoramiento financiado por el proyecto del Banco Interamericano de Desarrollo y el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (BID-FONACIT) N° 26110 2004-000410, a través del Sub-proyecto "Búsqueda de Marcadores Moleculares Asociados a la Resistencia a la Bacteriosis común en caraota", se realizaron cruzamientos usando parentales resistentes a la enfermedad, originando 9 poblaciones F_2 .

Las plantas F_2 fueron caracterizadas y evaluadas con marcadores moleculares SSRs, donde cinco marcadores resultaron polimórficos; y se realizó el análisis de asociación entre los marcadores moleculares polimórficos y el gen de mayor resistencia identificado.

Se verificó el origen heterocigoto de las plantas F_1 por medio de los SSR polimórficos y la segregación obtenida para los marcadores moleculares con la segregación esperada en la población F_2 (Ramis *et al.*, 2007). A partir de las familias $F_{2:3}$ disponibles se obtuvieron las 98 familias $F_{2:4}$, material utilizado en este estudio. El objetivo del presente trabajo fue verificar la asociación entre marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR) y el gen de resistencia a la bacteriosis común en familias $F_{2:4}$ de caraota.

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación molecular se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua.

Material vegetal

Para el estudio se utilizaron 102 genotipos que incluían las familias $F_{2,4}$ y los testigos. En un principio se trabajó con 104 familias, sin embargo no todas sobrevivieron, por lo que solo se extrajo ADN de 98 y se realizó la evaluación molecular de asociación para un máximo de 71.

Las familias $F_{2,4}$ provenían del cruce entre el progenitor resistente XAN-154 y el susceptible MEM-0301013 a la bacteria *Xph*. Se utilizaron como testigos resistentes: XAN-154 y XAN-149, líneas avanzadas procedentes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y conservados en el Banco de germoplasma de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del Instituto de Genética, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela; y como testigos susceptibles MEM-0301013 y 'Tacarigua', procedentes del Banco de germoplasma del INIA-CENIAP.

Extracción de ADN

El ADN fue obtenido a partir de hojas jóvenes no expandidas, de cada una de las familias $F_{2,4}$ de caraota y testigos. El tejido fue macerado con nitrógeno líquido y se procedió a efectuar la extracción con tampón CTAB (2%), siguiendo la metodología de mini extracción de ADN de Gepts y Clegg (1989), Gepts y Koinange (1992); y Murray y Thompson (1980), empleadas en el Laboratorio de Genética Molecular (CIBA). La calidad y cantidad del ADN se verificó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Las

muestras de ADN fueron preparadas a una concentración final de 2,5 ng μL^{-1} .

Evaluación molecular

Con base en los resultados de Ramis *et al.* (2007) se obtuvo el genotipo para cada planta de las familias $F_{2,4}$ para los cebadores PV-ctt001, PV-atgc001, BM-140, BM-156 y BM-202 que mostraron posible asociación con el carácter resistencia cuando fue evaluado molecularmente el polimorfismo entre los progenitores del cruce simple, lo que permitió la obtención de las familias $F_{2,4}$ (Cuadro 1).

Amplificación de cada SSRs a través de la técnica de PCR

En general se utilizaron las condiciones estandarizadas por Ramis *et al.* (2007), tanto para la mezcla de reacción de amplificación (Cuadro 2), como para los programas del termociclador. La temperatura de alineación (TM) varió según el SSRs a amplificar. En los Cuadros 3 y 4 se presentan los programas de PCR utilizados para cada SSRs. Los fragmentos se separaron en geles de poliacrilamida al 6% con revelación en nitrato de plata (Arnao, 2003).

Análisis estadístico

Con los perfiles electroforéticos visualizados para cada familia y microsatélite se preparó una matriz de genotipaje, donde se le asignó alelo(s) a cada familia (Figura 1). La segregación esperada de la población $F_{2,4}$ para cada marcador molecular, se determinó a través del programa MapDisto Genetics V 6.3.

Cuadro 1. Marcadores moleculares tipo microsatélites.

Marcador SSRs	Secuencia de iniciadores	
BM-140	Secuencia antisentido	CCTACCAAGATTGATTTATGGG
	Secuencia sentido	TGCACAACACACATTTAGTGAC
BM-156	Secuencia antisentido	TGCTTGCATCTCAGCCAGAATC
	Secuencia sentido	CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC
BM-202	Secuencia antisentido	CCTTTACCCACACGCCTTC
	Secuencia sentido	ATGCGAAAGAGGAACAAT
PV-ctt001	Secuencia antisentido	GCGAGGCAGTTATCTTTAGGAGTG
	Secuencia sentido	CCAACCACATTCTTCCCTACGTC
PV-atgc001	Secuencia antisentido	TATGAGAGAAGCGGTTGGCAGC
	Secuencia sentido	TGCCACCACAGCTTTCTCCTC

Cuadro 2. Mezcla de reacción PCR-SSR.

Componente	Concentración	μL para 1 reacción
ADN	2,5 ng μl ⁻¹	10
Tampón Tris-HCL	5X	4
dNTPs	10μM	0,4
Primer F	100μM	0,2
Primer R	100μM	0,2
MgCl ₂	25μM	2
Taq	5u μl ⁻¹	0,2
BSA	1mg ml ⁻¹	1
H ₂ O		2
Volumen final		20

Cuadro 3. Programa de PCR para microsatélites tipo BM.

Programa para SSR (BM)	
Paso 1	92 °C x 3 min
Paso 2	92 °C x 15 seg
Paso 3	50 °C x 15 seg
Paso 4	72 °C x 15 seg
Paso 5	Ir al paso 2 / 34 ciclos
Paso 6	72 °C x 5 min
Paso 7	14 °C indefinido

Cuadro 4. Programa de PCR para microsatélites tipo PV.

Programa para SSR (PV)	
Paso 1	94 °C x 2 min
Paso 2	92 °C x 30 seg
Paso 3	54,5 °C x 30 seg
Paso 4	72 °C x 1 min
Paso 5	Ir al paso 2 / 30 ciclos
Paso 6	72 °C x 5 min

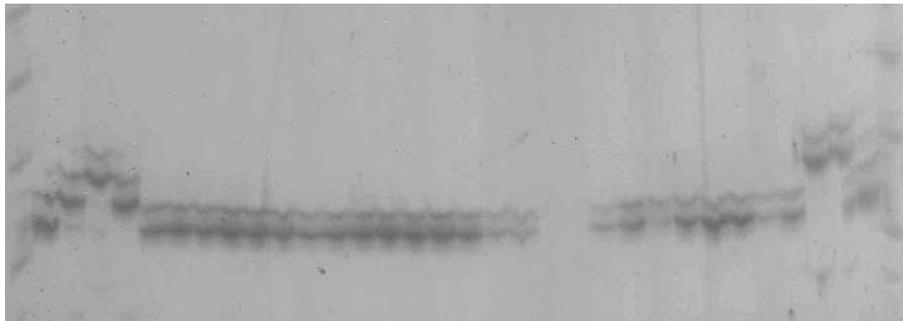


Figura 1. Visualización de los perfiles electroforéticos en familias $F_{2.4}$ del cruce entre XAN-154 y MEM-0103013 y los testigos, en gel de poliacrilamida al 6% para el microsatélite PV-ctt001.

A fin de realizar el análisis de asociación de cada marcador con la resistencia a la bacteriosis común de la caraota, las plantas $F_{2.4}$ se clasificaron en resistentes cuando el valor de la escala de evaluación estaba comprendida entre 1 y 4; y susceptibles para más de 5. En vista de que Ramis *et al.* (2007) demostraron que la resistencia es un carácter dominante, a las plantas se le asignó el genotipo R cuando eran resistentes y rr para las susceptibles; y se realizó un análisis para detectar los grupos de ligamiento empleando el mismo programa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de segregación

En el Cuadro 5 se presentan los genotipos para cada marcador SSRs y progenitor, así como la frecuencia de las 71 familias homocigotas:heterocigotas para cada marcador. Durante el proceso de endocria desde F_2 hasta F_4 no se realizó ninguna selección dirigida, por tal razón se espera que la frecuencia de genotipos para cada gen SSRs corresponda a la esperada para una población de líneas endocriadas.

El microsatélite BM-140 se comportó como marcador monomórfico, por lo que no fue posible diferenciar entre familias resistentes a *Xph*, tampoco se pudo realizar el análisis de asociación, ni seleccionar las plantas a partir del registro del marcador.

Las frecuencias de genotipos en las familias $F_{2.4}$ no correspondió a la esperada 1:1; por el contrario, se obtuvo un exceso de homocigotas,

hacia el progenitor XAN-154 (bb), con la excepción del SSR PV-atgc001 donde las homocigotas correspondieron al genotipo del progenitor MEM-0301013 (Cuadro 5). Estos resultados pudieran deberse a la presión de selección presente en las plantas F_2 .

Las plantas F_2 fueron inoculadas con la bacteria *Xph*, la presión de selección ejercida ocasionó la muerte de numerosas plantas susceptibles, por lo que la descendencia obtenida, semillas $F_{2.3}$, en su mayoría corresponderían a las de las plantas resistentes. De existir alguna asociación entre los SSRs y la resistencia, es de esperar la orientación hacia el progenitor resistente, para los alelos de los marcadores moleculares.

Es significativo señalar que la evaluación molecular de asociación se realizó para un máximo de 71; no con los 98 materiales, y posiblemente las proporciones esperadas no correspondan con las observadas (se rechaza la hipótesis nula de la segregación), tal vez por el número de materiales evaluados.

Es importante señalar que se identificaron familias con presencia de plantas heterocigotas, lo cual persiste en etapas tempranas de endocria. A nivel del programa de mejoramiento, se señala que se debe seguir avanzando hasta llegar a un mayor nivel de homocigosis, y entonces realizar la selección individual de plantas; finalmente obtener una línea experimental homocigota de alta resistencia y rendimiento, para iniciar el proceso de evaluación en distintas localidades.

Asociación de los marcadores moleculares con la resistencia

La asociación entre marcadores moleculares y características agronómicas, para poblaciones segregantes con menos de 100 familias, ha sido realizada por varios autores en caraota. Santos *et al.* (2003) para complementar un mapa genético del frijol común basado en el cruce entre un genotipo susceptible 'HAB-52' y un genotipo resistente 'BAC-6' utilizaron 88 plantas F_2 para mapear y analizar regiones genómicas relacionadas con la resistencia a *Xanthomonas*.

El análisis de ligamiento se llevó a cabo por el Software MAPMAKER / EXP usando 143 marcadores RAPD, lo que genera un mapa que se utiliza para detectar QTL asociados con *Xanthomonas* en caraota.

Igualmente, Lara (2012) realizó la búsqueda de un marcador molecular del gen *circumlineatus* en semillas de *Phaseolus vulgaris* para su incorporación en el mapa genético del frijol, empleando 12 plantas de genotipos contrastantes en poblaciones segregantes hasta F_5 ; siendo analizados usando PCR con 57 microsatélites, entre los que se encontraban BM-156 y BM-202.

Los Cuadros 6 y 7 presentan los valores de la fracción de recombinación (r) y los de Lod Score obtenidos entre los marcadores SSRs y el gen mayor de resistencia, respectivamente. Los resultados obtenidos confirman la asociación entre los SSRs BM-156, BM-202 y PV-ctt001. A pesar de haber evaluado 71 familias, se detectó asociación entre esos marcadores y el gen mayor de resistencia a *Xph*, lo que corrobora la utilidad de los SSR como una herramienta en los programas de mejoramiento para la resistencia.

Los SSRs BM-156, BM-202 y PV-ctt001 se encuentran ligados al gen de resistencia. No así con el marcador PV-atgc001 que se comportó como un locus independiente. Resultados similares obtuvieron Ramis *et al.* (2007), encontrando un valor r de 0,10 entre los marcadores BM-156 y BM-202.

Con respecto a la resistencia, Ramis *et al.* (2007) lograron detectar la asociación con el marcador Pv-ctt001 con un valor de r de 0,41. En esta oportunidad, y en consecuencia a la selección realizada por la inoculación con la bacteria *Xph* en las plantas F_2 , se incrementó la frecuencia de plantas resistentes y por lo tanto la mayor expresión de la asociación.

Cuadro 5. Evaluación de la segregación esperada de la población $F_{2:4}$ para cada microsatélite.

N°	SSR	Progenitores		Líneas $F_{2:4}$					
		XAN154	MEM0301013	aa	bb	n	ab	$\chi^2_{1:1}$	p
1	BM-156	bb	aa	10	55	65	1	31,15	0,00000
2	BM-202	bb	aa	2	50	52	15	44,31	0,00000
3	PV-atgc001	bb	aa	60	1	61	0	57,07	0,00000
4	PV-ctt001	bb	aa	10	51	61	10	27,56	0,00000

Cuadro 6. Valores de la fracción de recombinación (r) obtenidos entre marcadores moleculares y el gen mayor de resistencia a *Xph*, en una población de familias $F_{2:4}$ de caraota (*P. vulgaris*).

	BM-156	BM-202	PV-atgc001	PV-ctt001
BM-202	0,04			
PV-atgc001	0,50	0,50		
Pv-ctt001	0,03	0,05	0,50	
resistencia	0,02	0,01	0,50	0,03

El valor del Lod Score en el análisis de asociación entre una característica y un marcador molecular, se puede interpretar como la probabilidad que los datos observados se derivan de un QTL presente de uno ausente. Si el valor de Lod Score sobrepasa un umbral, generalmente entre 2 y 3, es un indicio de que un QTL está en el marcador molecular evaluado.

En el Cuadro 7, los valores para la asociación entre el gen de resistencia y los SSR BM-156, BM-202 y PV-ctt001, fueron de 8,49; 7,48 y 5,89; respectivamente. Esto es importante debido a que los valores de Lod Score siempre fueron mayores a 5, teniendo en cuenta que 3 es el valor mínimo de Z que se requiere para poder afirmar que existe ligamiento significativo entre dos loci.

Existe una relación de ligamiento entre la resistencia a *Xph* y los SSRs BM-156, BM-202 y PV-ctt001; indicando que los loci están suficientemente próximos entre sí, de forma que no se produce recombinación entre ellos en cada división meiótica. Garzón (2012) y Herrera (2011), en sus trabajos utilizando SSR en *Phaseolus vulgaris* hallaron a BM-156 ubicado en el grupo de ligamiento B02; también reportan que el BM-202 no ha sido mapeado por lo que no presenta anclaje a un grupo de ligamiento.

En la Figura 2 se presenta gráficamente el grupo de ligamiento para los SSRs BM-156, BM-202 y PV-ctt001 asociados al gen de la resistencia *Xph*, el cual se puede utilizar para identificar familias que porten el alelo b (XAN-154) en estado homocigota para los tres microsatélites. Dichas familias pueden escogerse mediante la selección asistida con marcadores (SAM).

Cuadro 7. Valores de LODSCORE obtenidos entre marcadores moleculares y el gen mayor de resistencia a *Xph*, en una población de familias $F_{2:4}$ de caraota (*P. vulgaris*).

	BM-156	BM-202	atgc001	cctt001
BM-202	5,25			
atgc001	0,00	0,00		
ctt001	8,25	4,20	0,00	
resistencia	8,49	7,48	0,00	5,89

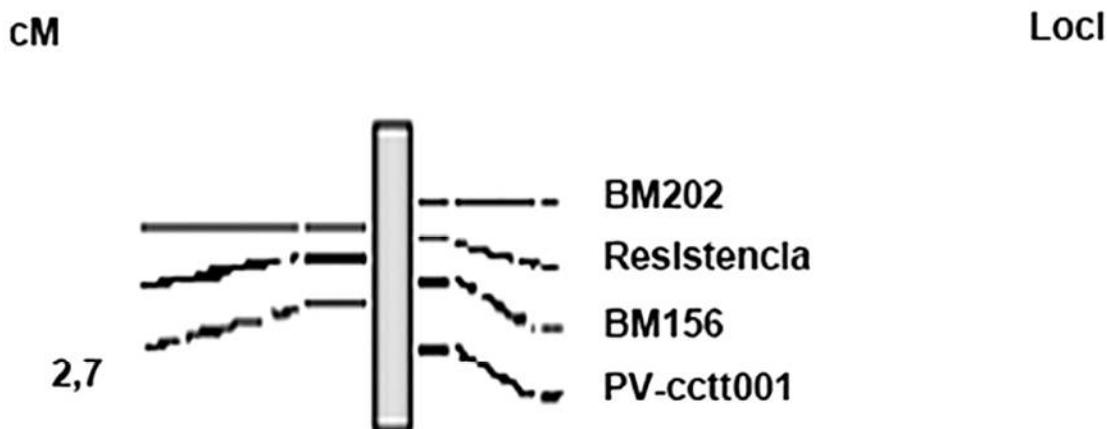


Figura 2. Mapa de ligamiento obtenido entre tres marcadores microsatélites y un gen mayor de resistencia a *X. phaseoli* en una población de familias $F_{2:4}$ de caraota (*P. vulgaris*).

CONCLUSIONES

Se verificó la asociación entre microsatélites (SSRs): BM-156, BM-202 y PV-ctt001 y el gen mayor de resistencia a *Xph*, en familias avanzadas F_{2,4} de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.); los SSR BM-156, BM-202 y PV-ctt001 se encuentran ligados al gen de resistencia.

La selección asistida utilizando los SSRs BM-156, BM-202 y PV-ctt001 hacia el alelo "b", será de gran utilidad para identificar familias portadoras de la resistencia con las cuales continuar el programa de mejoramiento, escogiendo plantas que porten el alelo "b" en estado homocigota para los tres microsatélites.

LITERATURA CITADA

- Arnao, E. 2003. Aplicación de marcadores moleculares en la recuperación del padre recurrente en el mejoramiento por retrocruza para la resistencia a *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. Trabajo de grado para optar al título de magister scientiarum. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 66 p.
- Cruz, S., P. Ramírez, R. García, F. Castillo y J. Sandoval. 2004. Selección para la resistencia al tizón común en frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27(2):141-147.
- Cruz, S., P. Ramírez, B. Tlapal, I. Ramírez, R. García, J. Sandoval y F. Castillo. 2001. Producción masiva de *Xanthomonas axonodopis* pv. *phaseoli* (Smith). *Agrociencia*. 35:575-581.
- Gaitán, E., M. Duque, K. Edwards and J. Tohme. 2002. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science*. 42:2128-2136.
- Garzón, L. 2012. Homólogos de genes de resistencia en frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su aplicación en resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*. Trabajo de grado para optar al Título de doctor en Ciencias Agropecuarias, área agraria con énfasis en Fitopatología. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía, Escuela de posgrados Bogotá, Colombia. 217 p.
- Gepts, P. and E. Koinange. 1992. Hybrid Weakness in Wild *Phaseolus vulgaris* L. *The Journal of Heredity*. 83(2):135-139.
- Gepts, P. and M. Clegg. 1989. Genetic Diversity in Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*) [L.] R. Br.) at the DNA Sequence Level. *The Journal of Heredity*. 80(3):203-208.
- Herrera, N. 2011. Saturación del mapa genético de una población intra-acervo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) empleando marcadores moleculares tipo SSR y SSCP. Trabajo de grado para optar al título de bióloga. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Colombia. 122 p.
- Jung, G., P. Skroch, D. Coyne, J. Nienhuis, E. Arnaud, H. Ariyaratne, S. Kaeppler and M. Basset. 1997. Molecular-marker based genetic analysis of tepary bean derived common bacterial blight resistance in different developmental stages of common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 122(3):329-337.
- Jung, G., D. Coyne, P. Kroch, J. Nienhuis, E. Arnal, J. Bokosi, S. Kaeppler, and J. Steandman. 1994. Construction of a genetic linkage map and location of common blight, rust resistance and pubescence loci in *Phaseolus vulgaris* L. using amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bean Improvement Cooperative*. 37:37-38.
- Lagarde, P., A. Medina, C. Ramis y A. Maselli. 2010. Evaluación de la resistencia a la bacteriosis común causada por *Xanthomonas phaseoli* en plantas F3 de caraota (*Phaseolus vulgaris*). *Fitopatología Venezuela*. 23(2):35-39.
- Lara, L. 2012. Evaluación del gen circumlineatus en la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con marcadores moleculares microsatélites. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 17 p.

- Maselli, A., L. Rosales y Y. Guevara. 2006. Uso de extractos vegetales sobre *Xanthomonas phaseoli*, causante de la quemazón en *Phaseolus vulgaris* L. CENIAP HOY, N° 12.
- Mekbib, F. 2003. Yield stability in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. Euphytica. 130:147-153.
- Miklas, P., E. Johnson, V. Stone, J. Beaver, C. Montoya and M. Zapata. 1996. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. Crop Science. 36:1344-1351.
- Mutlu, N., K. Vidaver, D. Coyne, J. Steadman, P. Lambrecht and J. Reiser. 2008. Differential Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* Strains on Bean Genotypes with Common Blight Resistance. Published by The American Phytopathological Society. Plant Disease. 92(4):546-554.
- Murray, M. and W. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Reporter. 8:4321-4325.
- Mwale, M., J. Bokosi, C. Masangano, M. Kwapata, V. Kabambe and C. Miles. 2008. Yield performance of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines under Researcher Designed Farmer Managed (RDFM) system in three bean agro-ecological zones of Malawi. African Journal of Biotechnology. 7(16):2847-2853.
- Nodari, R., S. Tsai, P. Guzman, R. Gilbertson and P. Gepts. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. Genetics. 134:341-350.
- Nunes, W., M. Corazza, S. Dias, S. Mui and E. Kuramae. 2008. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolates. Summa Phytopathologica. Botucatu, Brasil. 34(3):228-231.
- Park, S., A. Dursun, D. Coyne and G. Jung. 1996. Identification of RAPD markers linked to major genes for common bacteria. Annual Report Bean Improvement Cooperative. 39:128-129.
- Ramis, C., A. Medina, A. Maselli, M. Pérez, O. Movil, L. Salazar, J. Jiménez, A. Bedoya, M. Gutiérrez, D. Pérez y M. Gutierrez. 2007. Informe final del subprograma: Búsqueda de marcadores moleculares asociados a la resistencia a la bacteriosis común (*Xanthomonas phaseoli*) en caraota. BID-FONACIT II; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA-CENIAP, Laboratorio de Bacteriología; Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Centro de Investigación en Biotecnología Agrícola (CIBA). Maracay, Venezuela.
- Santos, A., R. Bressan, M. Pereira, R. Rodrigues and C. Ferreira. 2003. Genetic Linkage Map of *Phaseolus vulgaris* and Identification of QTLs Responsible for Resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Fitopatología Brasileira (jan-fev). 28(1):5-10.
- Salomón, J. 2002. Evaluación y selección de familias F₂ en F₃ de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) por su reacción a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Trabajo de grado para optar al título de Magister Scientiarum. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 70 p.
- Yu, K., S. Park, V. Poysa and P. Gepts. 2000. Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) The American Genetic Association. 91:429-434.
- Yu, Z., R. Stall and C. Vallejos. 1998. Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans. Crop Science. 38:1290-1296.

Evaluación de condiciones de almacenamiento y crecimiento de microbulbos de ajo provenientes de cultivo *in vitro*

Evaluation of storage conditions and growth in greenhouse of microbulbs of garlic from tissue culture

Adriana A. Pardo Roldán^{1*}, Gregorio A. Cabrera Osechas¹ y Nancy J. Hernández¹

¹Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Decanato de Agronomía. Unidad de Biotecnología Vegetal. *Correos electrónicos: apardo@ucla.edu.ve, pardoadriana@yahoo.es

RESUMEN

El desarrollo de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.) producidos en laboratorio y su adaptación a condiciones de casas de cultivo, puede ser considerado un paso previo para los programas de mejoramiento, ya que garantiza la producción masiva de clones libres de plagas y enfermedades. A tal fin, se establecieron ensayos de laboratorio y almacenamiento en casas de cultivo de ajo clon 'Boconó'. Durante el almacenamiento, los bulbos fueron separados por tamaño y sometidos a tres temperaturas (4, 10 y 23 °C) y dos condiciones lumínicas (iluminación-oscuridad) durante 45 días para posteriormente ser sometidos a condiciones de cámara húmeda usando Promix® como sustrato. Los microbulbos procedentes de la etapa anterior, fueron transferidos a canteros fijos en la casa de cultivo del INIA (Cubiro, estado Lara). Se analizaron datos por estadística paramétrica y no paramétrica. La microbulbificación ocurrió a partir de brotes cultivados en Murashige y Skoog con 2 mg L⁻¹ de 2ip y 90 mg L⁻¹ de sacarosa. Independientemente de las condiciones lumínicas, las temperaturas de almacenamiento de 4 y 10 °C favorecieron la emisión de grelo y los mayores promedios para diámetro y peso de microbulbos. Los microbulbos almacenados a 4 y 10 °C respondieron favorablemente al trasplante a condiciones de cámara húmeda, registrando los mayores promedios para las variables altura de plantas y número de hojas. En casas de cultivo, los materiales almacenados a 10 °C presentaron los mayores promedios para las variables del follaje y bulbo. Estos resultados pueden contribuir a la producción de semilla básica de ajo y su incorporación a programas de mejoramiento.

Palabras claves: *Allium sativum* L., bulbificación, mejoramiento genético, semilla básica.

ABSTRACT

Microbulbs development of garlic (*Allium sativum* L.) produced in the laboratory and its adaptation to conditions of growing houses, can be considered a prerequisite for breeding programs because it ensures mass production of clones free of pests and diseases. For such purpose, laboratory, storage and growing house tests were established with 'Boconó' garlic. During storage phase, bulbs were separated by size, and were subjected to three temperatures (4 °C, 10 °C and 23 °C) and two light conditions (illumination and darkness) for 45 days. Subsequently, microbulbs were grown in humid chamber using Promix® as substrate. Microbulbs from the previous stage, were transferred to fixed beds in the growing house at INIA (Cubiro, Lara state). Data were analyzed by parametric and non-parametric statistics. Microbulbification occurred from shoots grown in Murashige and Skoog with 2 mg L⁻¹ 2ip and 90 mg.L⁻¹ of sucrose. Regardless of lighting conditions, storage temperatures of 4 and 10 °C, favored the issuance of sprouts and the highest averages for microbulb diameter and weight. Microbulbs stored at 4 and 10 °C responded favorably to transplant to humid chamber conditions, recording the highest averages for the variables plant height and number of leaves. In the growing houses, materials stored at 10 °C showed the highest averages for both foliage and bulb variables. These results can contribute to the production of basic seed of garlic and their incorporation into breeding programs.

Key words: *Allium sativum* L., bulbification, breeding plant, basic seed.

Recibido: 30/04/14

INTRODUCCIÓN

Investigaciones previas consideran que factores como competencia por nutrientes, que se requiere para el desarrollo simultáneo de bulbos e inflorescencias; el aborto de óvulos de plantas fértiles; condiciones ambientales adversas; presencia de enfermedades sistemáticas en el cultivo y mutaciones deletéreas (Brewster, 2001; Mathew *et al.*, 2011), entre otras; han propiciado que la mayoría de los cultivares de ajo sembrados en la actualidad sean estériles, y por ende, carentes de semilla botánica. Debido a esto, los agricultores hacen uso para la siembra, de propágulos (dientes) de cosechas anteriores, generalmente de procedencia desconocida, contribuyendo a la diseminación de enfermedades, a una baja tasa de multiplicación de la especie y a la reducción de los rendimientos netos en las principales zonas hortícolas.

Específicamente en Venezuela, el cultivo del ajo es sembrado, cada año, por un menor número de agricultores, en áreas o parcelas cada vez más reducidas, lo cual ha traído como consecuencia que una gran cantidad de este rubro sea importado, lo que genera una considerable fuga de divisas.

Para solventar esta problemática se deben desarrollar programas de mejoramiento genético con énfasis en la calidad y producción masiva de bulbos, dientes o “semillas” que permitan cubrir la demanda, así como los requerimientos por parte de agricultores y consumidores.

Al respecto, el desarrollo de microbulbos, mediante el cultivo de tejidos y su posterior adaptación a condiciones de vivero, garantiza la propagación masiva de clones de ajo libres de plagas y enfermedades, y su posterior incorporación en programas de producción de semillas certificadas para la siembra.

Se ha reportado el éxito de la bulbificación *in vitro* del ajo siguiendo dos etapas: 1) Iniciación de brotes a partir de ápices caulinares (Bhojwani, 1980; Moriconi *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 2003; Luciani *et al.*, 2006) y; 2) Bulbificación en medios nutritivos como el de Murashige y Skoog (1962), en presencia de 2-isopentilamina (2ip), como regulador y de la sacarosa, como fuente de carbohidrato (Nagakubo *et al.*, 1993; Mujica y Mogollón, 2004; Mujica *et al.*, 2008).

Con relación al traslado a condiciones de vivero o casas de cultivo, diversos autores señalan que para el almacenamiento de los microbulbos se deben considerar factores como: temperatura, iluminación y tiempo de almacenamiento (James *et al.*, 2009; Ahn *et al.*, 2012; Palmero *et al.*, 2013), para favorecer la ruptura o periodo de latencia (Vázquez *et al.*, 2006), a los fines de facilitar una mayor sobrevivencia en campo (Burba *et al.*, 2007; Burba, 2009).

Por lo anteriormente señalado, se planteó como objetivo evaluar el desarrollo de microbulbos del clon ‘Boconó’ de *A. sativum* provenientes de cultivo *in vitro* bajo condiciones de casas de cultivo, con el propósito de obtener semilla básica y dar inicio a programas de mejoramiento genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA) en Tarabana, estado Lara. Asimismo, la evaluación de campo se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA); Campo Experimental Las Cuibas, localidad de Cubiro, estado Lara, Venezuela.

Al inicio se colectaron bulbos de ajo (*Allium sativum* L.), tipo morado, de zonas hortícolas en Boconó, estado Trujillo, sobre los cuales se realizaron experimentos de laboratorio, almacenamiento y casas de cultivo descritos a continuación:

Experimentos en laboratorio

Iniciación de brotes: Se utilizaron brotes provenientes del cultivo de ápices caulinares, con una altura de 3 a 4 cm y de 3 a 4 hojas/brotes. Se siguió el protocolo establecido por Bhojwani (1980) y Zheng *et al.* (2003), utilizándose para ello el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), constituido por sus sales inorgánicas en concentraciones completas, 30 gL⁻¹ de sacarosa, vitaminas: tiamina-HCl (30 mg L⁻¹), ácido nicotínico (10 mg L⁻¹), piridoxina (1 mg L⁻¹), glicina (2 mg L⁻¹) y mioinositol (100 mg L⁻¹).

Los reguladores de crecimiento empleados fueron ácido naftalenacético (ANA) a una concentración de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ en combinación con 2-isopentilamina (Zip) a una concentración de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. El medio se dispensó en tubos de ensayo de $25 \times 150 \text{ mm}$, distribuidos con alícuotas de 20 ml por cada tubo, colocándose un ápice por tubo de ensayo. Los explantes de 4 mm de longitud cultivados en tubos de ensayos fueron ubicados en cuartos de crecimiento a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, iluminación de $13,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y fotoperíodo de 16 h durante 30 días .

Microbulbificación: Se emplearon brotes con una altura entre 3 a 4 cm , regenerados en condiciones *in vitro*, a los cuales se les eliminaron las raíces y el follaje dejando una pequeña sección de tallo. Los mismos fueron cultivados en medio MS con 90 mg L^{-1} de sacarosa y 2 mg L^{-1} de Zip (Mujica y Mogollón, 2004). Se colocó un brote por tubo de ensayo, los cuales fueron ubicados en cámaras de crecimiento, bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), iluminación ($13,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y fotoperíodo de 16 h durante dos meses.

Experimentos de almacenamiento y grelado: Una vez que los microbulbos estuvieron bien formados se procedió a eliminar los residuos del medio de cultivo y se mantuvieron a temperatura

ambiente para su curado o rápida deshidratación de las hojas externas (Figura 1).

Posterior a este proceso, los microbulbos fueron separados por sus diámetros ecuatoriales, a saber: diámetro 1 (entre $10,9$ a $15,6 \text{ mm}$) y diámetro 2 (entre $5,5$ a $8,9 \text{ mm}$ de diámetro), colocándose en bandejas plásticas con tapa para su traslado a cavas de almacenamiento con tres diferentes temperaturas (4 , 10 y $23 \text{ }^\circ\text{C}$) y dos condiciones lumínicas (iluminación y oscuridad) durante 45 días . De esta manera se conformaron 12 tratamientos (Cuadro 1).

Se aplicó un diseño completamente al azar con 12 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Las variables a evaluar a los 45 días fueron: emisión del grelo, emisión de raíces, peso de microbulbos (mg) y diámetro mayor de microbulbos expresado en mm .

Para analizar estadísticamente las variables emisión de grelo y emisión de raíces se empleó la vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) con la prueba de medias por comparación de rangos múltiples, indicándose sus respectivos promedios; mientras que para el peso y diámetro de microbulbos se utilizó el análisis de la varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia del 5% .



Figura 1. Microbulbos de ajo en etapa de almacenamiento.

Cuadro1. Tratamientos establecidos para evaluar el efecto del almacenamiento y gelado de microbulbos de ajo clon "Boconó".

Tratamiento	Diámetro	Temperatura (°C)	Condición Lumínica
T1	1	4	Iluminación
T2	2	4	Iluminación
T3	1	10	Iluminación
T4	2	10	Iluminación
T5	1	23	Iluminación
T6	2	23	Iluminación
T7	1	4	Oscuridad
T8	2	4	Oscuridad
T9	1	10	Oscuridad
T10	2	10	Oscuridad
T11	1	23	Oscuridad
T12	2	23	Oscuridad

Experimentos en casa de cultivo

Pre-desarrollo de microbulbos: Durante esta etapa, los microbulbos fueron "pre-acondicionados" a los fines de estimular el gelado o rompimiento de la latencia antes de ser llevados a condiciones de canteros fijos. De esta manera, se consideró la procedencia de los microbulbos durante la etapa de almacenamiento, correspondiendo el tratamiento 1 a los microbulbos de diámetro 1, sometidos a condición de almacenamiento de 4 °C de temperatura e iluminación; y así sucesivamente (Cuadro 1).

El pre-desarrollo se realizó en cámara húmeda, empleando bandejas plásticas con tapa de 20x10x10 cm usando Promix® como sustrato. De igual manera, se trasplantaron cinco microbulbos por bandeja utilizándose cuatro bandejas por tratamiento. Las bandejas plásticas fueron ubicadas en la casa de cultivo y se mantuvieron tapadas por un lapso de 15 d, realizando riegos interdiarios hasta completar los 30 d.

Se utilizó un diseño de experimentos en bloques completos al azar con 12 tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas a los 15 y 30 d fueron: altura de brotes (cm) y número de hojas/brotes.

Para ambas variables se utilizó el análisis de la varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia de 5%.

Desarrollo de microbulbos en casas de cultivo: Los microbulbos, procedentes de la etapa anterior fueron, trasferidos a canteros fijos en la casa de cultivo localizada en la estación del INIA-Cubiro. Se utilizó como sustrato una mezcla de tierra negra, pergamino de café descompuesto y aserrín de coco en una proporción de 2:2:1, el cual fue previamente esterilizado con Basamid. El material fue sembrado en hileras de 15 cm de largo, con una distancia de 5 cm entre plantas.

Para la siembra de este ensayo, se consideró la procedencia de los microbulbos correspondientes a la etapa de almacenamiento y gelado (Cuadro 1). Debido a la respuesta en la etapa anterior (pre-desarrollo), los tratamientos se diferenciaron en el número de brotes o rebrotes producidos, por lo que el número de plantas sembradas por tratamiento varió en este ensayo; transplantándose solo los mejores tratamientos (7) de la etapa anterior; a saber: T₂ y T₁₁ (23 °C iluminación y oscuridad), T₉ (10 °C oscuridad), T₁ (4 °C iluminación), T₃ y T₁₀ (10 °C iluminación y oscuridad) y T₇ (4 °C oscuridad), respectivamente.

Se empleó un diseño completamente al azar con 7 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento.

Las variables evaluadas relacionadas al follaje fueron: altura de la planta (cm), número de hojas de la planta, longitud de la hoja (cm) y ancho de la hoja (cm).

Las variables relacionadas con el bulbo cosechado fueron: diámetro ecuatorial del bulbo (mm), longitud del bulbo (mm), número de dientes por bulbo, peso fresco (g) y peso de 50 dientes (g). Para todas las variables se utilizó el análisis de la varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimentos en laboratorio

La iniciación de los brotes a partir de ápices ocurrió en un 98% cuando fueron cultivados en el medio MS suplementado con 0,1 mg L⁻¹ de ANA y 0,5 mg L⁻¹ de 2ip, permitiendo el desarrollo de un solo brote por tubo de ensayo con promedios de altura de 4 a 4,6 cm. Con relación a la efectividad de este medio para la iniciación en *A. sativum* a partir de ápices, los resultados corroboran

investigaciones previas realizadas por Bhojwani (1980) y Zheng *et al.* (2003).

Microbulbificación: ocurrió a partir de brotes cultivados en MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de 2ip y 90 mg L⁻¹ de sacarosa, permitiendo el desarrollo de un solo microbulbo por tubo de ensayo. Los resultados evidencian la eficiencia del protocolo para la regeneración de microbulbos de *Allium sativum*, tal como lo ha indicado previamente Mujica y Mogollón (2004) y Mujica *et al.* (2008).

Experimentos de almacenamiento y gelado: el análisis de la varianza detectó diferencias significativas entre los 12 tratamientos evaluados para la variable emisión de grelo (Cuadro 2) y no significativas para emisión de raíces.

Para emisión de grelo, la prueba de comparación de medias separó los tratamientos en tres grupos (Cuadro 2). En un primer grupo, se ubicaron los materiales con diámetro 2 (Ø₂), almacenados a 10 °C (T₄ y T₁₀) en condiciones de iluminación y oscuridad, respectivamente.

En un segundo grupo e independientemente de las condiciones lumínicas y el diámetro, se agruparon los tratamientos con 10 °C (T₃ y T₉),

Cuadro 2. Emisión de grelo en microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.), sometidos a tres temperaturas (4, 10, 23 °C) y dos condiciones lumínicas (iluminación y oscuridad), a los 45 días de su almacenamiento.

Tratamiento	Emisión de grelo	
	Media	Rango
4	0,6	82 a
10	0,6	82 a
2	0,0	70 b
8	0,1	52 ab
5	0,1	52 ab
11	0,2	58 ab
1	0,2	58 ab
7	0,3	64 ab
3	0,4	70 ab
9	0,4	70 ab
12	0,0	46 b
6	0,0	46 b

Valores con la misma letra no difieren al nivel de P≤0,05, según comparación múltiple de rangos. Estadística no paramétrica prueba de Kruskal-Wallis.

4 °C (T_1, T_8, T_7) y 23 °C (T_5, T_{11}); mientras que en el último grupo los tratamientos a 4 °C (T_2) y 23 °C (T_6 y T_{12}), estos últimos con diámetros entre 5,5 a 8,9 mm (\varnothing_2).

Con respecto al grelado, los resultados sugieren que los mecanismos fisiológicos son diferentes a 4 y 23 °C, lo cual coincide con autores como Vázquez *et al.* (2006) y James *et al.* (2009), quienes señalaron que entre 4-10 °C se producen cambios en el metabolismo de la fructosa y su transporte a los brotes, lo cual favorece la brotación y la producción de follaje. Así mismo, durante esta etapa se observó que independientemente de las condiciones lumínicas, los microbulbos con diámetros comprendidos entre 5,5 y 8,9 mm (\varnothing_2) almacenados a 10 °C, emitieron grelo pero no raíces.

Similares resultados fueron reportados por Breswter (2001); Burba *et al.* (2007) y Burba (2009), quienes determinaron la rápida brotación en bulbos de ajo almacenados a 10 °C, en

comparación con una lenta brotación cuando se almacenaron a 4 y 23 °C. Lo anteriormente señalado, demuestra la importancia del control de la temperatura sobre la brotación tardía y precoz de los bulbos a ser utilizados como semillas.

Para las variables diámetro y peso de microbulbos la prueba de Tukey separó los tratamientos en 8 y 6 grupos, respectivamente (Cuadro 3).

Con respecto al diámetro, un primer grupo se conformó por los microbulbos almacenados en oscuridad a 10 °C (T_9) con un promedio de 12,74 mm. Entre el segundo y octavo grupo se ubicaron, independientemente de las condiciones lumínicas, los materiales sometidos a 23 °C (T_5, T_6, T_{11}), 10 °C (T_3, T_4, T_{10}) y 4 °C (T_1, T_2, T_7, T_8); mientras que el menor promedio lo presentó el tratamiento a 23 °C y oscuridad (T_{12}) con 6,46 mm.

Para el peso de microbulbos, los almacenados a 4 °C (T_7) y 10 °C (T_9) se ubicaron en un primer

Cuadro 3. Diámetro ecuatorial y peso de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.) a los 45 días de almacenamiento a tres temperaturas y dos condiciones lumínicas.

Tratamiento	Valores a los 45 días	
	Diámetro (mm)	Peso (mg)
9	12,74 a	761,3 a
7	12,37 ab	794,2 a
5	11,03 abc	675,8 ab
1	10,59 dcb	562,8 b
3	10,91 abc	570,5 b
11	10,69 abc	688,2 ab
2	9,26 cde	506,6 bc
8	8,54 def	356,3 cd
10	8,29 ef	352,6 cd
4	8,07 ef	315,6 d
6	7,91 ef	327,0 cd
12	6,46 f	238,1 d
CV%	26,5	29,3

Valores con la misma letra no difieren al nivel de $P \leq 0,05$ según la prueba de Tukey.

grupo, con 794,2 y 761,3 mg, respectivamente, seguido por la condición a 23 °C (T_{11} y T_5), en oscuridad e iluminación, respectivamente. Los restantes grupos se conformaron por los materiales almacenados a 10 °C (T_3 , T_4 , T_{10}), 23 °C (T_6 , T_{12}) y 4 °C (T_1 , T_2 , T_8) con promedios de peso entre 570,5 a 238,1 mg.

Los resultados sugieren que durante esta etapa, los microbulbos con diámetros entre 10,9 a 15,6 mm (\emptyset), almacenados bajo condiciones de oscuridad y temperaturas de 4 °C (T_7) y 10 °C (T_9), mostraron los mayores promedios para las variables evaluadas (diámetro y peso). Estos resultados se corresponden a lo reportado por Vázquez *et al.* (2006), quienes señalaron que entre 4-10 °C, la latencia en el ajo finaliza rápidamente favoreciendo la brotación y por ende el desarrollo de bulbos.

Por el contrario, a 23 °C de temperatura (T_6 y T_{12}) se retrasa la brotación incidiendo en una mayor pérdida de humedad y agua en los

tejidos, provocándose de esta manera una disminución de peso de los microbulbos bajo estas condiciones.

Experimentos en casas de cultivo

Desarrollo de microbulbos: los análisis obtenidos para las variables altura de brotes (cm) y número de hojas en brotes regenerados a partir de microbulbos, mostraron diferencias significativas a los 15 y 30 días de evaluación durante la etapa de pre-desarrollo o pre-acondicionamiento antes de la etapa de vivero (Cuadro 4).

Para la variable altura de brotes, evaluada a los 15 días, la prueba de Tukey separó los tratamientos en cinco grupos. De esta manera, los microbulbos almacenados en oscuridad y temperaturas de 4 °C (T_7) y 10 °C (T_9), se ubicaron en un primer y segundo grupo, respectivamente, con promedios de 2,19 y 2,01 cm de altura; mientras que en el tercer y

Cuadro 4. Altura de brotes (cm) y número de hojas/brotes de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.), a los 15 y 30 días de pre-desarrollo bajo condiciones de cámara húmeda.

Tratamientos	15 días		30 días	
	Altura de brotes (cm)	Número de hojas	Altura de brotes (cm)	Número de hojas
7	2,19 a	1,49 a	4,73 a	3,58 ab
9	2,01 ab	1,46 ab	4,71 a	3,75 a
10	1,73 abc	1,30 abc	4,27 ab	3,48 abc
3	1,47 abc	1,32 abc	3,83 abc	3,50 abc
8	1,45 abc	1,27 abc	4,13 abc	3,41 bcd
4	1,44 abc	1,18 abc	3,37 bc	3,26 cd
1	1,35 abc	1,18 abc	3,54 bc	3,29 bcd
2	1,33 abc	1,14 abc	3,80 abc	3,35 bcd
11	1,14 bc	1,07 bc	3,40 bc	3,25 cd
5	1,00 c	1,00 c	3,30 bc	3,20 cd
6	1,00 c	1,00 c	3,17 c	3,17 d
12	1,00 c	1,00 c	3,30 bc	3,19 cd
CV%	15,9	14,4	12,8	13,3

Valores con la misma letra no difieren al nivel de $P \leq 0,05$, según comparación múltiple de rangos. Estadística no paramétrica prueba de Kruskal-Wallis.

cuarto grupo, independiente de las condiciones lumínicas, los tratamientos a 10 °C (T_{10} , T_3 , T_4), 23 °C (T_{11}) y 4 °C (T_1 , T_2 , T_8), quedando en el quinto grupo los materiales almacenados a 23 °C (T_{12} , T_5 y T_6), con promedios de 1 cm de altura.

Para el número de hojas/brotes, la prueba de Tukey diferenció los tratamientos en cinco grupos. Los tratamientos en oscuridad y diámetro 1 (\emptyset_1) bajo condiciones de 4 °C (T_7) y 10 °C (T_9) se ubicaron en el primer y segundo grupo, con promedios de 1,49, y 1,46 hojas, respectivamente. El tercero, cuarto y quinto grupo se conformó por las condiciones a 10 °C (T_3 , T_4 , T_{10}), 23 °C (T_{11}) y 4 °C (T_1 , T_2 , T_8) tanto en oscuridad como en iluminación; mientras que en el último los tratamientos a 23 °C (T_5 , T_6 , T_{12}) con promedios de 1 hoja por planta (Cuadro 4).

Trascurridos los 30 días de pre-desarrollo, la prueba de Tukey diferenció los tratamientos en cinco y seis grupos para las variables altura de brotes y número de hojas/brotes (Cuadro 4).

Con relación a la altura de brotes, los microbulbos almacenados en oscuridad a 4 °C (T_7) y 10 °C (T_9) conformaron el primer y segundo grupo, con promedios de altura de 4,73 y 4,71 cm, respectivamente; mientras que en el tercero, cuarto y quinto, independiente de las condiciones lumínicas y de su diámetro, se ubicaron los tratamientos a 10 °C (T_3 , T_4 , T_{10}), 4 °C (T_1 , T_2 , T_8) y 23 °C (T_5 , T_{11}), con promedios entre 4,27 y 3,30 cm de altura; por su parte el último lugar lo ocupó el tratamiento a 23 °C iluminación (T_6) con 3,17 cm.

Para el número de hojas, los tratamientos bajo condiciones de oscuridad a 10 °C (T_9) y 4 °C (T_7) se ubicaron en el primer y segundo grupo, con un promedio de cuatro hojas. El tercero, cuarto y quinto grupo se conformó, independiente de las condiciones lumínicas y su diámetro, por materiales almacenados a 10 °C (T_3 , T_4 , T_{10}), 23 °C (T_5 , T_{11} , T_{12}) y 4 °C (T_1 , T_2 , T_8); mientras que en el último grupo a 23 °C, iluminación (T_6), con un promedio de 3 hojas por planta.

Durante la etapa de pre-desarrollo, los microbulbos con diámetros comprendidos entre 10,9 y 15,6 mm, previamente almacenados bajo condiciones de oscuridad y temperaturas de 4 y 10 °C (T_7 y T_9), respondieron favorablemente y registraron los mayores promedios para las

variables evaluadas (altura y número de hojas/brotes) durante las dos fechas de evaluación (15 y 30 días); mientras que independientemente de las condiciones lumínicas, los menores promedios se observaron en los materiales con diámetros entre 5,5 a 8,9 mm almacenados a 23 °C (T_{12} y T_6).

Estos resultados son similares a lo señalado por Brewster (2001) quien determinó que la elongación de los brotes y la formación de hojas en diversos clones de *A. sativum* es mayor entre 5 a 10 °C, en comparación a aquellos materiales almacenados a temperaturas mayores a 20 °C.

Lo anteriormente señalado demuestra la importancia del control de la temperatura durante el almacenamiento, para garantizar el crecimiento y desarrollo de microbulbos durante la etapa de pre-desarrollo.

Desarrollo de microbulbos en casas de cultivo: los análisis obtenidos para las variables relacionadas con el follaje (altura de la planta, número de hojas, longitud y ancho de la hoja) y con el bulbo (diámetro y longitud del bulbo, número de dientes, peso fresco y peso de 50 dientes) mostraron diferencias significativas a los tres meses de desarrollo en casas de cultivo (Cuadro 5).

Para la variable altura de planta, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C tanto en iluminación como en oscuridad (T_6 y T_{11}), con promedios de altura de 8,13 y 8,11 cm, respectivamente. En un segundo grupo las condiciones de 10 °C oscuridad (T_9) y 4 °C iluminación (T_1); mientras que en el tercer grupo e independiente de las condiciones lumínicas a 10 °C (T_3 y T_{10}) y 4 °C (T_7), con promedios entre 5,69 a 6,09 cm.

Con relación al número de hojas, la prueba de Tukey separó los tratamientos en dos grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C, tanto en iluminación como en oscuridad (T_6 y T_{11}) con un promedio de 3,30 y 3,29 hojas; mientras que en un segundo grupo, e independientemente de las condiciones lumínicas, los microbulbos almacenados previamente a temperaturas entre 4 °C (T_1 , T_7) y 10 °C (T_3 , T_9 , T_{10}), con promedios entre 2,77 y 2,59 hojas.

Cuadro 5. Altura de planta (cm), número de hojas, longitud de la hoja (cm) y ancho de las hojas (cm) de brotes procedentes de microbulbos de *Allium sativum* L. a los tres meses bajo condiciones de casas de cultivo.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Longitud de hoja (cm)	Ancho de hoja (cm)
6	8,13 a	3,30 a	6,91 a	1,76 a
11	8,11 a	3,29 a	6,52 ab	1,67 a
9	6,50 ab	2,77 b	5,13 c	1,39 b
1	6,41 ab	2,68 b	5,29 bc	1,35 b
3	6,09 c	2,65 b	4,89 c	1,40 b
7	5,79 c	2,61 b	4,61 c	1,31 b
10	5,69 c	2,59 b	5,06 c	1,29 b
CV%	15,9	13,8	12,6	11,3

Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$) según la prueba de Tukey.

Para la variable longitud de la hoja, las condiciones a 23 °C tanto en iluminación como en oscuridad (T_6 y T_{11}) conformaron el primer y segundo grupo, con promedios de 6,91 y 6,52 cm, respectivamente; mientras que en el tercero y cuarto, independientemente de las condiciones lumínicas, se ubicaron los materiales almacenados a 10 °C (T_9 , T_3 , T_{10}) y 4 °C (T_1 y T_7), con promedios entre 5,29 y 4,61 cm.

Similar al comportamiento observado para el número de hojas, la prueba de Tukey separó al ancho de la hoja en dos grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C, tanto en iluminación como en oscuridad (T_6 y T_{11}) con un promedio de 1,76 y 1,67 cm, respectivamente y en el segundo grupo los restantes tratamientos a 10 °C (T_9 , T_3 , T_{10}) y 4 °C (T_1 y T_7), con promedios entre 1,40 a 1,29 cm.

En relación a las variables relacionadas con el bulbo, para el diámetro ecuatorial, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos (Cuadro 6). En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados en oscuridad a 23 °C (T_{11}) con 6,46 mm; mientras que en el segundo bajo las condiciones a 10 °C (T_{10} , T_9 y T_3) y 23 °C (T_6), con promedios entre 6,33 y 5,31 mm. En el último grupo se ubicaron los materiales a

4 °C y oscuridad (T_7) con promedio de 5,09 mm de diámetro.

Con respecto a la longitud del bulbo (mm), la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. Un primer grupo se conformó por los microbulbos almacenados en oscuridad tanto a 10 °C (T_9) como a 23 °C (T_{11}) con 5,83 y 5,75 mm, respectivamente. En un segundo grupo se ubicaron aquellos almacenados, tanto en iluminación como en oscuridad, a 23 °C (T_6), 10 °C (T_3 y T_{10}) y 4 °C (T_1), con promedios entre 5,64 y 5,00 mm; mientras que en el tercer grupo en condiciones de oscuridad a 4 °C (T_7) con promedio de 4,84 mm de longitud.

Para el número de dientes por bulbo, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En el primer y segundo grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C, tanto en oscuridad como iluminación (T_{11} y T_6) con promedios de 6 a 4 dientes; mientras que en el tercer grupo, independientemente de las condiciones lumínicas, los tratamientos a 10 °C (T_9 , T_{10} y T_3) y 4 °C (T_1 y T_7) con promedios entre 2 y 3 dientes por bulbo.

Para el peso fresco (g), la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos sometidos a 23 °C y oscuridad (T_{11}) con 5,34 g, mientras que en el segundo los materiales almacenados

Cuadro 6. Diámetro ecuatorial del bulbo (mm), longitud del bulbo (mm), número de dientes, peso fresco (g), y peso de 50 dientes (g), de bulbos de *Allium sativum* L. cosechados a los tres meses de estar bajo condiciones de casas de cultivo.

Tratamiento	Diámetro ecuatorial (mm)	Longitud bulbo (mm)	Número dientes/bulbo	Peso fresco (g)	Peso 50 dientes (g)
11	6,46 a	5,75 a	5,56 a	5,34 a	4,07 b
9	6,33 ab	5,83 a	3,45 b	4,31 ab	7,88 a
6	6,28 ab	5,64 ab	4,41 ab	4,25 ab	1,40 c
3	6,14 ab	5,41 ab	3,50 b	4,00 ab	0,98 c
1	5,85 ab	5,21 ab	2,72 b	3,38 ab	0,30 c
10	5,31 ab	5,00 ab	2,61 b	3,05 b	0,30 c
7	5,09 b	4,84 b	2,49 b	2,97 b	0,30 c
CV%	11,2	10,3	13,3	10,2	11,8

Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$) según la prueba de Tukey.

a 10 °C en oscuridad (T_9) y en iluminación a 10 °C (T_3), 23 °C (T_6) y 4 °C (T_1). Por su parte, en el tercer grupo se ubicaron los tratamientos en oscuridad a 10 °C (T_{10}) y 4 °C (T_7).

Con respecto al peso de 50 dientes, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En un primer y segundo grupo se ubicaron los microbulbos almacenados en oscuridad a 10 °C (T_9) y 23 °C (T_{11}) con promedios de 7,88 y 4,07 mg, respectivamente; mientras que en el tercer grupo e independientemente de las condiciones lumínicas, los almacenados a 23 °C (T_6), 10 °C (T_3 y T_{10}) y 4 °C (T_7 y T_1), con promedios entre 1,40 y 0,30 mg.

Durante la etapa de desarrollo, los microbulbos almacenados previamente a 23 °C (T_6 y T_{11}), presentaron los mayores promedios para las variables relacionadas con el follaje y el bulbo, seguido por la condición de oscuridad a 10 °C (T_9); mientras que los menores promedios fueron observados en materiales almacenados en oscuridad a 4 °C (T_7).

Los resultados indican que los microbulbos almacenados a 23 °C experimentaron un retraso en la formación de brotes y microbulbos durante las etapas de almacenamiento y pre-desarrollo; sin embargo, una vez transcurrido el ciclo de desarrollo en las casas de cultivo, las plantas crecieron vigorosamente y se desarrollaron mejor. Esto puede ser atribuido a que los

materiales vencieron el periodo de latencia más lentamente usando pocas sustancias de reserva.

Cabe destacar, que los microbulbos almacenados a 10 °C, además de presentar altos valores promedios para las variables evaluadas durante las etapas de almacenamiento y pre-desarrollo, lograron expresar todo su potencial y madurez fisiológica, al ser trasplantados al cantero, así como follajes y bulbos bien desarrollados o definidos en comparación de los materiales a 4 °C.

Con respecto a las condiciones de almacenamiento de los materiales en oscuridad y temperaturas de 4 °C (T_7), los resultados indicaron que los microbulbos dirigieron todas las reservas de la planta durante las primeras etapas (almacenamiento y pre-desarrollo) hacia la producción de hojas, con una evidente pérdida de agua, humedad y peso en el bulbo durante la etapa de desarrollo.

Estos resultados corresponden a lo reportado previamente por Breswter (2001), Vázquez *et al.* (2006), Burba *et al.* (2007) y Burba (2009), entre otros, quienes afirman que los bulbos del ajo requieren para su formación diversas rutas de desarrollo, en donde las condiciones ambientales, el genotipo y el tamaño, son factores determinantes.

En lo que respecta a las condiciones ambientales, la temperatura de almacenamiento puede influir en gran medida en el óptimo crecimiento de los materiales cuando son transferidos a casas de cultivo. De esta manera, se demuestra que las temperaturas previas a la siembra, afectaron el vigor, el crecimiento y el desarrollo de los materiales al ser pasados a condiciones de campo. En este sentido, en el clon 'Boconó' se observó diferentes respuestas a la temperatura durante las sucesivas fases requeridas para la formación del bulbo; evidenciando con ello la importancia del control de la temperatura durante el almacenamiento sobre las diferentes etapas del cultivo.

CONCLUSIONES

La información obtenida en esta investigación, es fundamental para el desarrollo de un programa de producción de semilla básica de ajo.

En este sentido, el almacenamiento de microbulbos de ajo, con diámetros comprendidos entre 10,9 a 15,6 mm, puede realizarse a temperaturas de 10 °C en oscuridad, ya que bajo estas condiciones se favoreció la ruptura del periodo de latencia rápidamente, así como la formación precoz del bulbo.

Asimismo, cuando los materiales previamente almacenados a esta temperatura fueron transferidos a casas de cultivo, los bulbos mostraron un óptimo diámetro y peso, además de dientes de mayor tamaño, lo cual facilitará la producción de un gran número de semillas de óptima "calidad" y con ello la ejecución de programas de mejoramiento genético en el clon 'Boconó'.

RECOMENDACIÓN

La información generada permite recomendar a los agricultores de Cubiro, estado Lara, el almacenamiento de los bulbos o dientes de ajo a 10 °C de temperatura y condiciones de oscuridad, a los fines de minimizar la producción de bulbos rugosos, poco compactos y la formación de un solo diente entre otros trastornos fisiológicos, que suelen producirse cuando ocurren cambios bruscos y atípicos de temperatura propios de esta zona.

AGRADECIMIENTO

A Paúl Azuaje Pardo y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por el financiamiento otorgado.

LITERATURA CITADA

- Ahn J., G. Kim, K. Akram, K. Kim and J. Kwon. 2012. Effect of storage conditions on photostimulated luminescence of irradiated garlic. *Food Research International*. 47:315-320.
- Bhojwani, S. 1980. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*. 13:47-52.
- Burba, J., R. Ocañas, G. Lanzavechia y M. Paganini. 2007. Manejo de semilla básica de ajo en condiciones controladas. Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 23 p.
- Burba, J. 2009. Mejoramiento genético y producción de "semilla" de ajo (*Allium sativum* L), posibilidad de adaptación a diferentes ambientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 44 p.
- Brewster, J. 2001. Las cebollas y otros *Alliums*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 266 p.
- James, C., V. Seignemartin y S. James. 2009. The freezing and supercooling of garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Refrigeration*. 32:253-260.
- Luciani, G., A. Mary, C. Pellegrini y N. Curvetto. 2006. Effect of explant and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant cell tissue and organs culture*. 87:139-143.
- Mathew, D., Y. Forer, H. Rabinowitch and R. Kamenetsky. 2011. Effect of long photoperiod on the reproductive and bulbing processes in garlic (*Allium sativum* L.) genotypes. *Environmental and Experimental Botany*. 71:166-173.

- Moriconi, D., V. Conci and S. Nome. 1990. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton*. 51:145-151.
- Mujica, H. y N. Mogollón. 2004. Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro*. 16(1):55-60.
- Mujica, H., M. Sanabria, N. Mogollón y Y. Perozo. 2008. Formación *in vitro* del bulbo de ajo morado (*Allium sativum* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*. 25(2):197-210.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A review medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. *Physiología Plantarum*. 1:473-497.
- Nagakubo, T., A. Nagasawa and H. Ohkawa. 1993. Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 32:175-183.
- Palmero, D., L. Gálvez, M. García, J. Gil and S. Benito. 2013. The effects of storage duration, temperature and cultivar on the severity of garlic clove rot caused by *Fusarium proliferatum*. *Postharvest Biology and Technology*. 78:34-39.
- Vázquez, M., G. López., E. Mercado, E. Castaño and F. León. 2006. Study and prediction of quality changes in garlic cv. Perla (*Allium sativum* L.) stored at different temperatures. *Scientia Horticulturae*. 108:127-132.
- Zheng S., B. Henken, F. Krens and C. Kik. 2003. The development of an efficient cultivar independent plant regeneration system from callus derived from apical and non-apical segments of garlic (*Allium sativum* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology*. 39(3):288-292.

Método de extracción de la pectina metilesterasa (EC 3.1.1.11) en frutos de níspero

Design extraction method pectin methylesterase (EC 3.1.1.11) in sapodilla fruit

Angela M. Bedoya Gómez^{1*}, Catalina M. Ramis Jaime², Luis R. Angulo Graterol², Yreny K. De Faria Muñoz² y Antero R. Burgos Pérez¹

¹Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL), Instituto Rafael Alberto Escobar Lara, Maracay. Dpto. de Biología. ²Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía, Instituto de Genética. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA). *Correo electrónico: angelamaria74ve@gmail.com

RESUMEN

El níspero (*Manilkara zapota* [L.] 'Prolific') es un fruto cuyas dificultades de manejo postcosecha ha limitado su comercialización. Durante la maduración del fruto el cambio más drástico es la pérdida de firmeza, lo cual ocasiona la disminución de la calidad. Este ablandamiento está asociado a la acción de la pectina metilesterasa (PME, E.C. 3.1.1.11), la cual es una enzima que induce la degradación de la pared celular. El objetivo del trabajo fue diseñar un método de extracción de PME eficiente, de calidad, rápido y que utilice pocos reactivos. Se utilizaron frutos de níspero en estado de madurez fisiológica del Banco de Germoplasma INIA-CENIAP, estado Aragua, almacenados a -20 °C. Se diseñaron cinco métodos de extracción: Buffer Tris HCl; Buffer PBS; Nitrógeno líquido (N₂L); Buffer Tris HCl + N₂L y NaCl. Se evaluaron los métodos en función de la calidad de la enzima; cantidad (mg mL⁻¹ de proteína) y de extracción. En el análisis de varianza se detectaron diferencias altamente significativas (P<0,01) entre los métodos. La prueba de comparación entre medias de Duncan determinó que el Método de N₂L extrajo mayor cantidad de proteína (231 mg mL⁻¹) con una actividad catalítica de 1,97 μmol ácido min⁻¹, superando al grupo y control con valores que oscilan entre 0,13 μmol ácido min⁻¹ y 0,6 μmol ácido min⁻¹; siendo entonces, el método más eficiente, con mayor rendimiento y menor tiempo (dos horas). Se recomienda la purificación y caracterización de la PME con fines de aplicación agroindustrial y biotecnológico.

Palabras Clave: *Manilkara zapota*, ablandamiento, zapote, PME, actividad enzimática.

ABSTRACT

Sapodilla (*Manilkara zapota* [L.] 'Prolific') is a fruit whose difficulties of post-harvest management have limited its commercialization. During ripening of these fruits the most dramatic change is the loss of firmness, which causes the decrease in quality. This softening is associated with the action of the pectin methylesterase (PME, E.C. 3.1.1.11), which is an enzyme that induce degradation of the cell wall. The objective was to design a method for efficient extraction of PME, with high quality, fast and using few reagents. Physiologically ripen Sapodilla fruits from the Germplasm Bank INIA-CENIAP, Maracay, Aragua state, were used. They were stored at -20 °C. Five methods of extraction Buffer Tris HCl; Buffer PBS; Liquid nitrogen (N₂L); Buffer Tris HCl + N₂L and NaCl, were designed. Methods were evaluated according to enzyme quality, amount (mg mL⁻¹ protein) and extraction. The analysis of variance showed highly significant differences (P<0.01) among the methods and Duncan mean comparisons determined that the liquid nitrogen method extracted more protein (231 mg mL⁻¹) with a catalytic activity of 1.97 μmol acid min⁻¹, excelling the other methods and the control with values ranging from 0.13 μmol acid min⁻¹ up to 0.6 μmol acid min⁻¹. Therefore, the C method is the most efficient, with higher protein yield and lower time (two hours). However, purification and characterization of PME for either agroindustrial purposes or biotechnological application is recommended.

Key words: *Manilkara zapota*, softening, sapodilla, PME, enzymes activity.

INTRODUCCIÓN

El níspero (*Manilkara zapota* [L.] Van Royen var. Prolific) es un fruto poco comercializado por sus dificultades de manejo postcosecha, ocasionado por el ablandamiento rápido y desuniforme; generando la necesidad de realizar estudios en esta área. Actualmente existen diversos métodos que permiten extraer la enzima pectina metilesterasa (PME) a partir de la pulpa de los frutos; sin embargo, estos requieren de varias etapas para la extracción y el tiempo de ejecución oscila entre 6 y 24 horas; además, se necesita una gran variedad y cantidad de reactivos, que las hace costosas (Cuadro 1).

Otro aspecto importante a considerar es la presencia del látex en el níspero hasta etapas avanzadas, ya que los métodos analizados son aplicados a frutos que carecen de látex (Drayen y Van Cutsem, 2008; Vovk y Simonovska, 2007; Rodrigo *et al.*, 2006; Bedoya, 2002 y 2012). Por lo antes expuesto, se planteó la necesidad de diseñar un método de extracción que permita reducir el tiempo y evite la interferencia que ocasiona la presencia de látex en los frutos de níspero (Bedoya, 2012).

El níspero, es un fruto muy apetecido por su aroma y agradable sabor, siendo muy utilizado para la elaboración de jugos, merengadas y jaleas. De acuerdo a su fisiología es un fruto catalogado como altamente climatérico, es decir, que al alcanzar la madurez fisiológica incrementa rápidamente su tasa respiratoria, aumentando la degradación de sustancias (almidón, fructosa, carbohidratos de la pared y pigmentos) y, por ende, la sobremaduración y descomposición ocurren a los pocos días de la cosecha, con un ablandamiento desuniforme. Esto se ha convertido en una limitante para la comercialización del fruto, tanto para el consumo fresco como industrial, ya que es poca su durabilidad bajo condiciones de almacenamiento, ocasionando grandes pérdidas y haciendo poco rentable el cultivo (Laborem *et al.*, 1981; Rodríguez y Restrepo, 2011; Carabali *et al.*, 2009).

La pérdida de firmeza, aunque necesaria para lograr el máximo desarrollo sensorial, es uno de los factores que más contribuye con el deterioro del fruto, disminuyendo así su calidad (Carabali *et al.*, 2009), por lo que se ha generado

la necesidad de estudiar las causas de este proceso, a fin de minimizar sus efectos.

El ablandamiento ocurre debido a los cambios en la pared celular, siendo los más significativos los relacionados a sus componentes durante la maduración, como la concentración de las sustancias pécticas solubles en agua, las cuales aumentan ocurriendo paralelamente un descenso de los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas), debido a la solubilización de las pectinas; proceso atribuido generalmente a la acción de enzimas, entre las que se encuentra la pectina metilesterasa EC 3.1.1.11 (Díaz-Sobac *et al.*, 1997; Pérez-Almeida y Carpita, 2006; Rodríguez y Restrepo, 2011; Carabali *et al.*, 2009).

Durante la maduración de los frutos, la PME tiene por función la desesterificación del grupo carboxilo de los restos de ácido poligalacturónico, incrementando, como consecuencia, la susceptibilidad de las pectinas al ataque de las poligalacturonasas, las cuales degradan al ácido poligalacturónico (Micheli, 2001; Rodríguez y Restrepo, 2011; Carabali *et al.*, 2009).

Además del rol de la PME durante el reblandecimiento de la pared celular se han reportado otras funciones en diversos procesos como: microsporogénesis y crecimiento del tubo polínico, diferenciación celular cambial, germinación de semillas y elongación del hipocótilo. También se demostró que una isoenzima de la PME es receptora para una proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco (TMV). La interacción entre la proteína del movimiento del virus y la PME es necesaria para el desplazamiento del virus de célula a célula a través de los plasmodesmos (Micheli, 2001).

Asimismo, la PME ha sido utilizada en la agroindustria como estabilizadora en la turbidez de jugos o néctares, para clarificarlos e incrementar la extracción (Bajard *et al.*, 2006).

Estos aspectos ofrecen un panorama general sobre la importancia del estudio de esta enzima para su aplicabilidad en el manejo postcosecha y en la agroindustria. Por lo que es importante ofrecer una técnica que permita extraerla de los tejidos del fruto, manteniendo su integridad estructural y catalítica.

Cuadro 1. Resumen de las diferentes metodologías de extracción de la PME y sus isoenzimas. Se presentan los pasos y los reactivos utilizados por cada grupo de autores.

Drayen y Van Cutsem (2008)	Vovk y Simonovska (2007)	Rodrigo <i>et al.</i> (2006)	Bedoya (2002)
Metodología extracción de PME			
1. Las muestras de fresa se maceraron con N ₂ líquido.	1. Se utilizaron frutos de tomate. Se homogeneizaron 500 g de pulpa (sin piel) con 500 ml de agua fría. Se ajustó a pH 3 con 1 M de HCl.	1. Se utilizaron frutos de tomate. Se homogeneizaron 500 g de pulpa con 750 ml de agua destilada fría por 2 min.	1. Se utilizaron frutos de níspero. Se les quitó el exocarpo.
2. Se resuspendió en buffer A (76 mM K ₂ HPO ₄ ; 27 mM KH ₂ PO ₄ ; 25 mM [EDTA]); 1 mM cisteína; 50 g l ⁻¹ [PVPP]; 1 mM [PMSF] pH 7,3).	2. El pellet obtenido fue centrifugado por 20 min a 8000 rpm.	2. Se ajustó a pH 3 con HCl 0,1 M. Se agitó por 15 min.	2. Se homogeneizaron durante 1 min en solución de NaCl 10%.
3. Se agitó en vortex por 30 min y el sobrenadante se centrifugó a 3000 g.	3. El pellet obtenido fue disuelto en 750 ml de NaCl 1,2 M (pH 6).	3. Se centrifugó por 20 min a 8000 g.	3. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 min.
4. Se descartó el pellet y se agitó nuevamente en vortex en 4 volúmenes buffer B (76 mM K ₂ HPO ₄ ; 27 mM K ₂ HPO ₄ ; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 1 mM cisteína; 50 g l ⁻¹ PVPP; 1 mM PMSF; pH 7,3).	4. La solución se centrifugó a 8000 rpm por 20 min.	4. El pellet fue resuspendido en agua destilada. Se ajustó a pH 3 con HCl 0,1 M.	4. El sobrenadante obtenido se sometió a diálisis durante toda la noche.
5. Se agitó por 60 min y se centrifugó por 30 min a 3000 g.	5. El pellet obtenido se disolvió en 500 ml de NaCl 1,2 M (pH 6). Se agitó por 3 h.	5. Se centrifugó a 8500 g por 20 min. El pellet se disolvió en NaCl 1,2 M; en proporción 1:1. Se ajustó a pH 6 con NaOH 0,1 M.	5. Se almacenó la muestra.
6. El sobrenadante se centrifugó por 30 min a 14000 g.	6. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 20 min.	6. Se agitó por 3 h. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 20 min.	6. Tiempo aproximado de procesamiento de 16-24 h.
7. Luego las muestras fueron dializadas durante toda la noche.	7. El sobrenadante fue filtrado en papel y luego a través de una membrana Millex-HV polihidrofílica (PVDF 0,45 µm).	7. Se recuperó el sobrenadante el cual contenía a la PME.	
8. Se almacenó la muestra dializada.	8. El filtrado obtenido se almacenó.	8. Tiempo aproximado de procesamiento 6-8 h.	
9. Tiempo aproximado de procesamiento: 16-24 h.	9. Tiempo aproximado de procesamiento 6-8 h.		

En la literatura se reportan diferentes métodos de extracción de la PME (Cuadro 1); sin embargo, el tiempo de ejecución y los materiales que se requieren son costosos, por tanto el objetivo de esta investigación fue diseñar un método de extracción rápido y eficiente, que utilice pocos reactivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron frutos en estado de madurez fisiológica (MF) de la colección activa del Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), Maracay, estado Aragua. Posteriormente, fueron trasladados al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (FAGRO-UCV), Maracay; lugar donde se procedió a lavarlos y almacenarlos bajo congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para luego utilizarlos en los ensayos respectivos.

Extracción de la PME

Se diseñaron cinco métodos de extracción, los cuales se evaluaron en función de la cantidad

de proteína obtenida, la actividad de la enzima y el tiempo de ejecución. Estos métodos se denominaron A, B, C, D y E (Figura 1). Inicialmente a todos los frutos se les retiró el exocarpo y las semillas, y fueron lavados para su posterior procesamiento.

Método A (Buffer Tris HCl)

Se maceraron 20 g de pulpa en un mortero con Buffer Tris-HCl (0,1 M; pH 8) en relación 1:1. Se centrifugó a 10000 rpm x 30 min, y se obtuvo un volumen de sobrenadante de 20 ml. El sobrenadante obtenido fue filtrado con lana de vidrio y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método B (Buffer PBS)

Se maceraron 20 g de pulpa en un mortero con 20 ml de PBS (Buffer fosfato monohidratado: K_2HPO_4 20 mM pH 7,4 y Buffer fosfato bihidratado: KH_2PO_4 20 mM pH 7,4; NaCl 0,45 M) en relación 1:1. El macerado obtenido se centrifugó a 10000 rpm x 30 min y el sobrenadante (17,5 ml) se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método C (Buffer Tris-HCl + N_2L)

Se tomaron 20 g de la pulpa y se pulverizó con N_2L . Luego se resuspendió en 20 ml de Tris-HCl

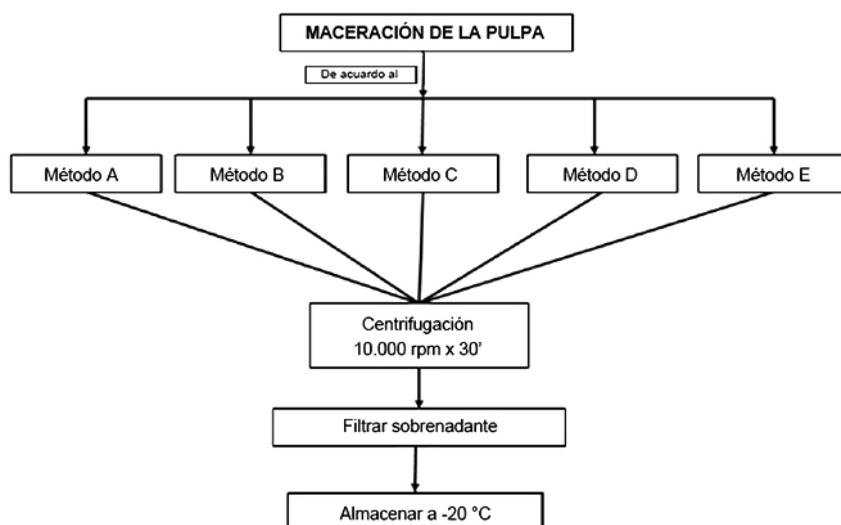


Figura 1. Esquema de la secuencia y las técnicas utilizadas para realizar la extracción de la PME a partir de frutos de níspero.

(0,1 M-pH 8) y se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (20 ml) se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método D (Buffer Tris HCl + N₂L)

Se maceraron 20 g de pulpa en mortero con 20 ml de Tris-HCl (0,1 M; pH 8) en relación 1:1, se separó la fase acuosa de la sólida; a la fase sólida se le agregó N₂L, se maceró nuevamente y se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (21 ml) se filtró con lana de vidrio y almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método E (NaCl)

Se homogeneizaron 20 g de la pulpa en 20 ml de NaCl 10% (relación 1:1) y se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (17,5 ml) se filtró con lana de vidrio y almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

El grupo control se preparó macerando 20 g de fruto con 20 ml de agua destilada (H₂O_d), la mezcla se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (18 ml) se filtró con lana de vidrio y almacenado a -20 °C.

Medición de la actividad de la PME

Para determinar la actividad de la enzima PME en los diferentes extractos se utilizó el método colorimétrico de Hagerman y Austin (1986). La

metodología consiste en realizar una mezcla de reacción con el extracto obtenido (enzima), el sustrato (pectina) y azul de bromofenol (Figura 2).

Cuando la PME remueve los grupos metil de la cadena de ácido poligalacturónico (demetila) se acidifica el medio y el descenso de pH genera un cambio en la coloración del azul de bromofenol, de azul a amarillo. Esto es captado por el espectrofotómetro y se mide la actividad de forma indirecta como un cambio en la absorbancia a 620 nm. Los valores fueron llevados a una curva patrón (Figura 3) elaborada de acuerdo a la metodología de Hagerman y Austin (1986), la cual se utilizó para transformar los valores de la absorbancia en micromoles de ácido producido/minuto ($\mu\text{mol ácido min}^{-1}$).

Para la mezcla de reacción, los volúmenes se ajustaron a la capacidad de un tubo vial de 1,5 ml (Figura 2) y se procedió a realizar el ensayo:

1. Preparación de las soluciones: pectina cítrica (PC) como sustrato al 1% en agua destilada, azul de bromofenol (AB) al 0,1% y el extracto del fruto de acuerdo a la metodología establecida.
2. En un tubo vial de 1,5 ml se agregó 938 μl de pectina cítrica (sustrato), 282 μl de extracto enzimático PME (EE) y 20 μl de azul de bromofenol (AB) al 0,1%.
3. La mezcla anterior se incubó en baño térmico a 30 °C durante 1 hora.

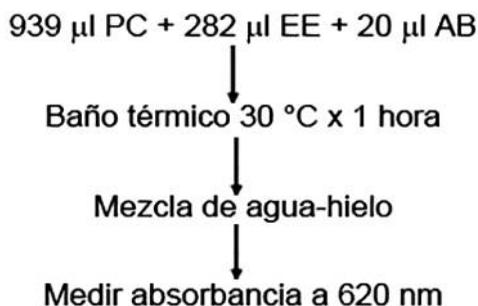


Figura 2. Esquema general para medir la actividad de la PME de acuerdo al método espectrofotométrico de Hagerman y Austin (1986).

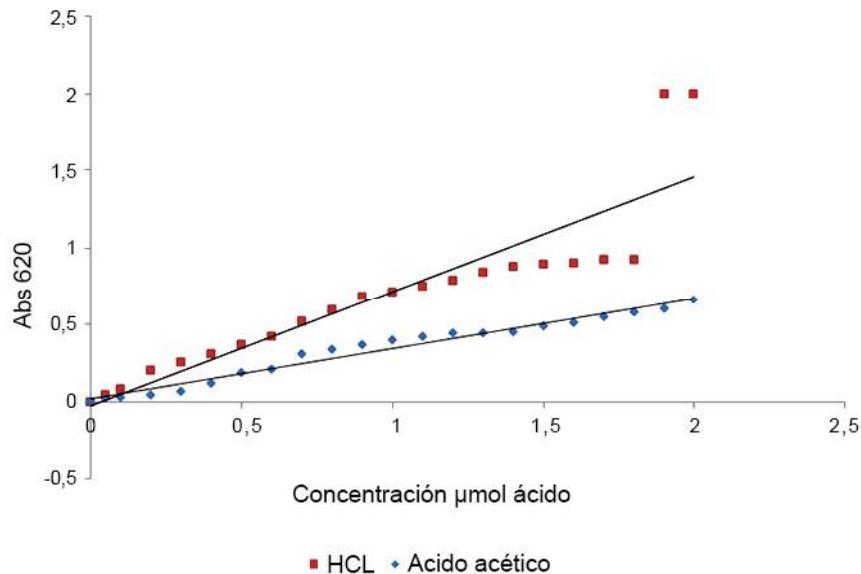


Figura 3. Curva de calibración para el ensayo espectrofotométrico de acuerdo a la metodología propuesta por Hagerman y Austin (1986). HCl (cuadros), ácido acético (rombos). Los valores mostrados son el resultado de las medias de tres repeticiones.

4. Baño de agua con hielo, para detener la reacción.

5. Se midió la absorbancia a 620 nm (Espectrofotómetro GENESYS 20).

Contenido de proteínas

Para este análisis se utilizó el método de Bradford (1976), que consiste en mezclar 0,1 ml del extracto y 5 ml del reactivo de Bradford. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos y para finalizar se midió la absorbancia a 595 nm (Espectrofotómetro Marca GENESYS 20). El blanco fue preparado sustituyendo el extracto por 0,1 ml de agua. Los valores fueron llevados a una curva patrón, elaborada con albúmina bovina (BSA). El contenido de proteínas fue expresados en miligramos de proteínas por cada mililitro de muestra (mg ml^{-1}).

Diseño y análisis estadístico

El diseño de la investigación fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento (Monzón, 1992). Posteriormente se realizaron los Análisis de Varianza (ANAVAR) y Pruebas de Medias correspondientes.

Para todos los análisis de varianza se verificaron los supuestos del análisis homogeneidad y normalidad. El Programa utilizado fue el MSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de la PME

Los resultados de la actividad de la PME, extraída por diferentes métodos se presentan en la Figura 4, donde se puede observar que el método más eficiente para la extracción de la PME, es el método C, obteniéndose un valor de actividad de $1,97 \mu\text{mol ácido min}^{-1}$. En el grupo control la actividad fue de $0,23 \mu\text{mol ácido min}^{-1}$.

La actividad obtenida en el método C representa el 856% respecto al grupo control, lo que indica un alto rendimiento en la extracción. Este resultado también permite deducir que se mantuvo la integridad molecular y catalítica de la enzima (Cuadro 2).

Estos resultados indican que la aplicación del N_2L y del Buffer Tris-HCl permitieron la solubilización de la PME, la cual se encuentra en la pared celular. Otra propiedad que ofrece el uso del N_2L es neutralizar el efecto del látex

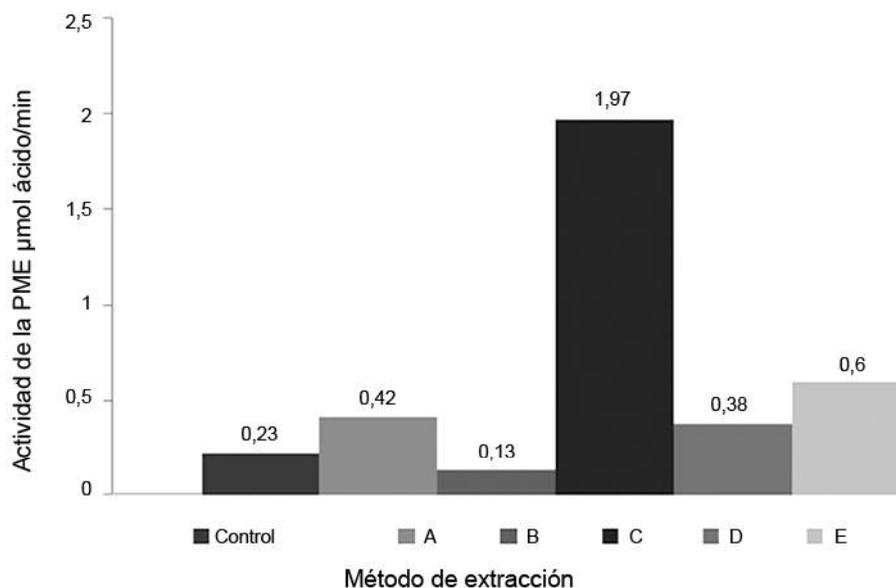


Figura 4. Actividad de la PME extraída por diferentes métodos a partir de la pulpa de frutos de Níspero. Control: Grupo Control. A: Método A. B: Método B. C: Método C. D: Método D. E: Método E.

Cuadro 2. Comparación de los diferentes métodos en cuanto a: actividad enzimática, cantidad de proteína, tiempo de extracción y reactivos utilizados.

Grupo	Actividad PME (μmol ácido min ⁻¹)	Actividad PME (%)	Contenido de proteínas mg ml ⁻¹	Tiempo de extracción (horas)	Reactivos y materiales utilizados
Grupo Control	0,23	100	201,6	2	H ₂ O _d
A	0,42	182	118	2	Buffer Tris HCl
B	0,13	56	210	2	Buffer PBS
C	1,97	856	231	2	N ₂ L Buffer Tris HCl
D	0,38	165	299	2	N ₂ L Buffer Tris HCl
E	0,6	260	291	2	NaCl

presente en la pulpa, evidenciándose la razón por la que no se formó la capa adherida a las paredes de los tubos; aspecto muy importante porque la presencia del látex afecta la extracción, la actividad y el proceso de purificación (Bedoya, 2002; 2012). Por otro lado, el Buffer Tris-HCl tiene un efecto iónico que permite solubilizar la enzima sin necesidad de dializar el producto (Carabali *et al.*, 2009).

En los valores obtenidos con el método C se puede observar una gran diferencia en la actividad de la enzima, con respecto a los otros métodos. Por ejemplo, en los métodos A y E los valores son de 0,42 y 0,6 μmol ácido min⁻¹, respectivamente, lo cual representan sólo el 21,3% y el 30,4% de actividad en relación al método C; sin embargo al ser comparados con la actividad obtenida en el grupo control, el método

A y el E permitieron una mayor extracción de la enzima, ya que la actividad obtenida representa un 182 y 260%, respectivamente, en relación al grupo control.

De igual manera los métodos B y D permiten extraer la proteína, pero los valores de actividad enzimática son muy bajos en relación al método C.

Durante la ejecución de cada uno de estos métodos fue importante el uso del buffer. Los resultados indican que el Buffer Tris-HCl utilizado en el método C es eficiente para la extracción. Sin embargo, en los métodos A y E donde se utilizó buffer Tris-HCl y NaCl, respectivamente, se obtuvieron valores altos de actividad (Cuadro 2). Diversos trabajos han utilizado una variedad de buffer o agua para hacer la extracción, dependiendo del tipo de fruto en estudio. El buffer no solo permite mantener el pH estable sino que solubiliza la enzima de la pared y mejora la actividad catalítica de la PME (Rodríguez y Restrepo, 2011 Carabali *et al.*, 2009).

Contenido de proteínas

En el método D se logró extraer la mayor cantidad de proteínas con un valor de 299 mg ml⁻¹, seguido del método E (291 mg ml⁻¹ de proteínas). En tercer lugar, con el método C se

extrajo 231 mg ml⁻¹ de proteína, pero este es el más alto en la actividad de la PME (Cuadro 2). Es decir, los métodos D y E permiten extraer mayor cantidad de proteína (Figura 5), pero cuando se determina la actividad de la PME se puede observar claramente que la actividad es muy baja en relación al método C (Figura 4).

Estos resultados sugieren dos posibilidades: la primera es que en los métodos D y E no se mantiene la integridad estructural y catalítica de la enzima, y la segunda es que se obtienen otras proteínas que no son la PME. Probablemente esto ocurre debido a que la metodología no es eficiente en la extracción de la PME, la cual está adherida a la pared celular.

En el análisis de varianza (Cuadro 3) se detectaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre los métodos. Se realizó la prueba de comparación entre medias de Duncan (Cuadro 4), la cual determinó que el método C evidenció una mayor actividad catalítica de PME (1,97 $\mu\text{mol ácido min}^{-1}$) y una cantidad de proteína de 231 mg ml⁻¹.

Tiempo y reactivos

El tiempo de ejecución de los métodos de extracción diseñados, es de dos horas, en comparación con los descritos en otros trabajos,

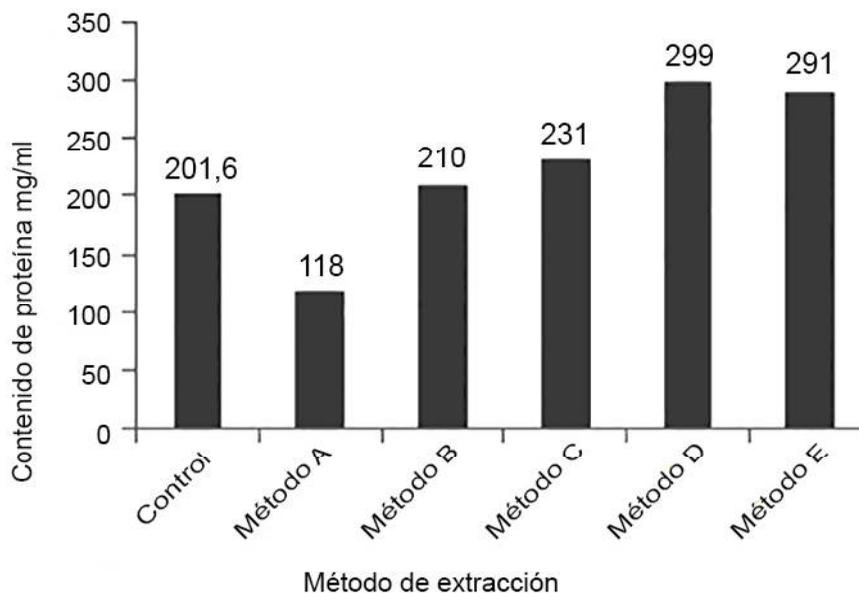


Figura 5. Contenido de proteína de los extractos crudos de pulpa de nispero procesados por diferentes métodos.

Cuadro 3. Análisis de Varianza de la Actividad de la PME y de la concentración de proteínas de los extractos obtenidos por los diferentes métodos de extracción.

Fuente de variación	gl	Cuadrados medios	
		Actividad PME ($\mu\text{mol ácido min}^{-1}$)	Concentración de proteínas (mg ml ⁻¹)
Repetición	2	0,002	16,194
Métodos de extracción	5	1,386	1z3249,42
Error	10	0,005	9,232
Total	17		
CV (%)		11,15	1,35

**Diferencias altamente significativas. Duncan (P<0,01).

Cuadro 4. Prueba de Medias de la actividad de la PME y la concentración de proteínas en las muestras extraídas con diferentes letras métodos de extracción.

Método de extracción	Actividad PME ($\mu\text{mol ácido min}^{-1}$)	Concentración de proteínas (mg ml ⁻¹)
Control	0,233 d	201,6 e
A	0,423 c	118,0 f
B	0,127 d	210,0 d
C	1,970 a	231,0 c
D	0,383 c	299,0 a
E	0,603 b	291,0 b

Letras diferentes denotan diferencias significativas.

donde el tiempo oscila entre 6 a 24 horas (Cuadro 1), lo cual representa una reducción entre 30-90%. Otra característica resaltante de los métodos descritos en este trabajo, es la poca cantidad de reactivos utilizados, lo cual disminuye los costos para su aplicación en posteriores investigaciones.

CONCLUSIÓN

Se diseñó un método rápido, eficiente y con pocos reactivos para la extracción de la PME a partir de frutos de níspero. El método C es el más eficiente en extracción por la calidad y cantidad de la enzima; al igual que por el tiempo empleado.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), a los investigadores Gaston Laborem y Grigna Piña del INIA por permitirnos utilizar los materiales del Banco de Germoplasma de Níspero.

Al profesor Angel Guadarrama del Laboratorio de Fisiología Postcosecha de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, por facilitarnos el uso de sus equipos.

LITERATURA CITADA

Bajard, C., C. Fauveau, C. Grassin y P. Pellerin. 2006. Enzimas para la enología. Modo de

- producción, modo de acción e Impacto en la transformación de la uva en vino. *Revista Enología* (Año III). 5:82-85.
- Bedoya, A. 2002. Actividad de las enzimas poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, celulasa y patrón de proteínas durante la maduración de frutos de níspero (*Manilkara zapota* var. Prolific). Trabajo para optar al grado de Magíster Scientiarum en Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 128 p.
- Bedoya, A. 2012. Purificación y caracterización de las isoenzimas de la pectina metilesterasa en frutos de níspero (*Manilkara zapota* var. Prolific). Tesis doctoral presentada como requisito para optar al título de doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 109 p.
- Bradford, M. 1976. A rapid sensitive assay for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Carabali, I., C. Narváez y L. Restrepo. 2009. Extracción y medida de actividad de pectin metil estearasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), enzima relacionada con el ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*. 14(2):73-82.
- Díaz-Sobac, R., J. De La Cruz, A. Vázquez, C. Beristain and H. García. 1997. Evaluation of softening and associated enzyme activities during the ripening of coated 'Manila' mangoes. *Journal Horticultural Science*. 72:749-753.
- Drayen, M. and P. Vat Cutsem. 2008. Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Physiology*. 165:1152-1160.
- Hagerman, A. and P. Austin. 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34:440-444.
- Laborem, G., M. Figueroa, L. Rancel y L. Bandres. 1981. Estudio de la calidad de la fruta en las principales variedades comerciales de níspero en Venezuela. VIII Convención Anual de Fruticultores. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). 12 p.
- Micheli, F. 2001. Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*. 6(9):414-419.
- Monzón, P. 1992. Introducción al diseño de experimentos. Alcance 34. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (FAGRO-UCV). Maracay. 167 p.
- Pérez-Almeida, I. y N. Carpita. 2006. Las β -galactosidasas y la dinámica de la pared celular. *Interciencia*. 31(7):476-483.
- Rodrigo, D., C. Corte's, E. Clynen, L. Schoofs, A. Van Loey y M. Hendrickx. 2006. Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties. *Food Research International*. 39:440-448.
- Rodríguez, J. y L. Restrepo. 2011. Extracción de enzimas pécticas del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* lam) involucradas en el proceso de ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*. 16(2):193-204.
- Vovk, I. and B. Simonovska. 2007. Isolation of tomato pectin methylesterase and polygalacturonase on monolithic columns. *Journal of Chromatography A*. 1144:90-96.

Evaluación de clones experimentales de caña de azúcar en etapas tempranas del programa venezolano para el desarrollo de variedades

Sugarcane clones evaluation at early stages Venezuelan variety development program

Rosaura Briceño Cárdenas^{1*}, Orlando De Sousa Vieira¹, Alida Díaz¹, Ramón Rea², Milagros Niño¹, Argenis Rivero¹, Gregoryd Aza¹ y José R. George¹.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Estación Local Yaritagua, estado Yaracuy. ²Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Baruta, estado Miranda. *Correos electrónicos: rbriceno@inia.gob.ve, rosaurab@hotmail.com.

RESUMEN

El Programa Venezolano de Desarrollo de Variedades de Caña de Azúcar (PVDVCA) se encuentra ubicado en la Estación Local Yaritagua, municipio Peña, estado Yaracuy, adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). El objetivo del programa es producir y seleccionar variedades venezolanas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido). El mismo comprende una serie de cinco etapas de selección, una fase de plántulas y cuatro de selección clonal, cuyo ciclo completo dura aproximadamente de 12 a 14 años. En este trabajo veintiocho clones, fueron evaluados en la IV etapa de selección, denominada Primer Ensayo Replicado, durante tres ciclos anuales y consecutivos, bajo un diseño en bloques al azar con tres repeticiones. Se evaluaron las variables: brotación (%), Pol % caña o sacarosa aparente, toneladas de caña por hectárea (TCH), toneladas de Pol por hectárea (TPH). Los resultados indicaron diferencias altamente significativas para la variable brotación, resaltando los clones V98-78, V98-95, V98-56 y V98-37, con un promedio de 40,58%. En cuanto a las variables de rendimiento, especialmente en TPH, los materiales que destacaron en todos los ciclos, superando a los testigos comerciales, fueron V98-62, V98-120, C266-70, C137-81 y V98-39, por encima de las 20 TPH, para el primer ciclo. Estos resultados, conjuntamente con las evaluaciones fitosanitarias, permitieron seleccionar estos genotipos experimentales para pasar a la etapa final del programa llamada ensayos regionales.

Palabras clave: *Saccharum* spp., híbrido, ensayos regionales, selección clonal.

Recibido: 01/04/14

ABSTRACT

The Venezuelan Sugarcane Variety Development Program (VSVDP) is located at the Yaritagua Experimental Station, Peña Municipality, state of Yaracuy, and it is ascribed to the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). The program's goal is to produce and select Venezuelan varieties of sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid). It comprises a series of five stages of selection, one seedling phase and four clonal selection phases, whose full cycle lasts about 12 to 14 years. In this work twenty-eight clones were evaluated in the selection stage IV, called Replicated First Essay, for three annual and consecutive cycles, under a randomized block design with three replications. Bud break (%), Pol %, apparent cane or sucrose content, tons of cane per hectare (TCH), pol tons per hectare (TPH) were evaluated. Results showed highly significant differences for sprouting, highlighting the clones V98-78, V98-95, V98-56 and V98-37, with an average of 40.58%. As for the yield related variables, especially in TPH, materials that excelled in all cycles, outperforming commercial genotypes were V98-62, V98-120, C266-70, C137-81 and V98-39, with above 20 TPH in the first cycle. These results, together with the phytosanitary evaluations allowed to select these experimental genotypes to move to the final stage of the program called regional trials.

Key words: *Saccharum* spp., hybrid, outfield trials, clonal selection.

INTRODUCCIÓN

Los cultivares de caña de azúcar son híbridos interespecíficos, que se originan de un proceso de hibridación y selección, con el fin de obtener cultivares mejorados adaptados a diferentes condiciones agroecológicas y con resistencia a las principales enfermedades e insectos plagas que permitan sustituir a aquellos que se encuentren en proceso de deterioro.

La selección en los programas de mejoramiento genético de caña de azúcar, comienza normalmente en una población de plántulas variables genéticamente derivada de semilla sexual; posteriormente se inician las etapas de propagación clonal, las cuales van a variar de acuerdo al programa de cada país. Los caracteres se fijan en la primera etapa de selección y estos después deben ser heredables y repetibles (Casalette y Ranjel, 1995).

El Programa Venezolano de Desarrollo de Variedades de Caña de Azúcar (PVDVCA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), actualmente tiene su sede en la Estación Local Yaritagua (ELY), estado Yaracuy. Este programa consiste básicamente de un banco de germoplasma compuesto por variedades de caña de azúcar venezolanas y otras provenientes de la mayoría de los países productores de caña de azúcar del mundo; una colección activa de progenitores seleccionados por su habilidad para producir progenie de calidad; una fase de cruzamientos (hibridación) para producir poblaciones variables genéticamente, y finalmente; la selección en etapas consecutivas de los mejores individuos existentes dentro de estas poblaciones.

Las etapas de selección en campo son denominadas: etapa I, plántulas en campo; etapa II, primer ensayo comparativo; etapa III, segundo ensayo comparativo; etapa IV, primer ensayo replicado y; etapa V, ensayos regionales o pruebas finales de variedades (De Sousa *et al.*, 2008).

Los criterios de selección del PVDVCA, que usualmente se consideran de importancia para la selección de nuevas variedades de caña de azúcar son: componentes del rendimiento en toneladas de caña y azúcar; apariencia de la planta (cañas erectas, desnudas y soqueras); resistencia a enfermedades e insectos plagas y;

usos alternos (agrocombustibles, cogeneración y forrajes).

La etapa IV, llamada primer ensayo replicado, es una prueba de rendimiento y es aquella que precede a los ensayos regionales, llevada por dos ciclos (planta y soca) y los criterios de selección: producción de azúcar, toneladas de caña para producir una tonelada de azúcar y producción de caña. El objetivo de este trabajo fue seleccionar clones experimentales de caña de azúcar de la serie Venezuela 1998, evaluados en la etapa IV del PVDVCA.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el campo experimental de la ELY, del INIA Yaracuy, ubicada en el municipio Peña del estado Yaracuy, a 10° 04' LN y 69° 07' LO y una altitud de 325 m.s.n.m. con precipitación media anual de 953 mm y temperaturas promedios anuales de 30,6 °C (máxima) y 20,3 °C (mínima). Los suelos donde se ubica la estación pertenecen a la serie Uribeque (Mendoza *et al.*, 1983) representados en gran porcentaje por el orden Alfisol (Latiegue, 2009). Esta estación es la sede del PVDVCA.

Siembra y establecimiento del ensayo

El estudio llamado primer ensayo replicado o etapa IV de selección, se sembró el 10 de Noviembre del 2004, en el tablón 8 del campo experimental de la ELY. Se utilizaron 19 materiales venezolanos experimentales de la serie V98, seis materiales extranjeros (dos cubanos [C] y cuatro de la República de Brasil [RB]) y tres testigos comerciales como fuente de comparación (Cuadro 1). Se conformaron 28 tratamientos en un área efectiva de 3780 m². El ensayo fue evaluado en tres ciclos planta, primera soca y segunda soca.

El diseño experimental utilizado fue bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones. Se establecieron parcelas experimentales de tres hilos de 10 m por material (45 m²) y separadas a 1,5 m y una densidad de siembra de 12 yemas por metro lineal.

Las variables medidas fueron porcentaje de brotación, Sólidos solubles totales (°Brix), Pol % caña o sacarosa aparente, toneladas de caña por hectárea (TCH) y toneladas de Pol por hectárea (TPH).

Cuadro 1. Clones sembrados en el primer ensayo replicado serie Venezuela 1998 (V98).

Clon	Progenitores (♀ x ♂)	Clon	Progenitores (♀ x ♂)
V98-07	PR61-632 x ?	V98-95	Gloria 58 x ?*
V98-10	PR69-2176 x ?	V98-106	CP74-2005 x ?
V98-13	Gloria 58 x ?	V98-117	C323-68 x ?
V98-15	Gloria 58 x ?	V98-119	SP71-6163 x ?
V98-33	Kassoer x ?	V98-120	Kassoer x ?
V98-35	Kassoer x ?	C137-81	B73-343 x Merceditas
V98-37	Gloria 58 x ?	C266-70	Co281 x POJ28-78
V98-39	PR61-632 x ?	RB84-5257	RB72-454 x SP70-1143
V98-56	B74-49 x ?	RB85-5035	L60-14 x SP70-1284
V98-62	C323-68 x ?	RB85-5536	SP70-1143 x RB72-454
V98-64	CP74-2005 x ?	RB85-5546	SP70-1143 x RB72-454
V98-78	Kassoer x ?	PR61-632 (T)	Co421 x POJ28-78
V98-80	C323-68 x ?	PR980 (T)	Co421 x POJ28-78
V98-87	Gloria 58 x ?	V64-10 (T)	CB36-24 @**

*? Padre desconocido, debido a que es producto de una polinización abierta en campo o cruce múltiple.

**@ Progenitor proveniente de una autofecundación de CB36-24.

Porcentaje de brotación

A los cuarenta y cinco días después de la siembra se realizó la observación de brotación, contando todos los brotes primarios de cada uno de los tres hilos de cada parcela. Se realizó el cálculo dividiendo el número de brotes observados por hilera, entre el número de sembrados por hilera y se multiplicó esta cifra por cien.

Muestreo de tallos (Determinación de Pol % caña)

Este muestreo se realizó cuando el cultivo tenía 11 meses de edad aproximadamente para los tres ciclos (planta, soca y resoca). La muestra que se tomó constó de 10 tallos molibles consecutivos a partir de un punto tomado al azar dentro de la hilera central de cada parcela experimental. Cada muestra fue identificada y enviada al laboratorio de tallos del INIA Yaracuy, donde fueron pesadas y procesadas mediante el método del jugo prensado descrito por Chen (1997), mediante un sacarímetro

modelo SacchAAr 880D. Los resultados fueron expresados como Pol % Caña (PPC), que representa la sacarosa aparente contenida en 100 partes de caña.

Cosecha (Rendimiento en TCH)

La cosecha se realizó a los 12 meses aproximadamente, pesando con ayuda de una cargadora de caña y un dinamómetro digital, toda la caña de cada parcela. A este dato se le sumó el peso correspondiente a las muestras extraídas para el análisis de jugo y fibra, para estimar el rendimiento en TCH y aunado al PPC, se determinó las TPH.

El diseño utilizado fue bloques completamente aleatorizados donde se realizó el análisis por ciclo y combinado para los tres ciclos de cosecha, utilizando la prueba de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher y el programa estadístico Infostat. Las variables dependientes fueron todas las de rendimiento industrial y agronómico: PPC, TCH y TPH, así como el

porcentaje de brotación; siendo las variables independientes, las variedades utilizadas en el ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de brotación

El porcentaje de brotación promedio de todo el ensayo estuvo en 32,94%, detectándose diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) entre variedades; fluctuando valores desde 44% en materiales como PR 61-632 hasta 22% en V98-106. Los materiales experimentales más resaltantes fueron las variedades V98-78, V98-95, V98-56 y V98-37 con valores de 42 y 40% (Cuadro 2). Esta fase del cultivo, considerada como una de las más importantes, está afectada por factores externos e internos tales como humedad, aireación y temperatura del suelo, además de yemas sanas, entre otros; que de

una u otra manera son determinantes en el desarrollo del cultivo (Smit, 2010; Netafim, 2014).

Por otro lado, en algunos trabajos se ha encontrado correlación entre la brotación y TCH (Ramón y Mendoza, 2002), no obstante en el ensayo, se determinó que no existe una correlación entre estos dos factores (0,15 y 0,45 de probabilidad, Cuadro 3), difiriendo de los autores arriba señalados. Sin embargo, los valores de rendimiento en TCH se pudieran atribuir a la uniformidad de la brotación en todo el área de siembra de cada parcela.

Resultados de rendimiento

La variable PPC estima el contenido de sacarosa aparente que pueda tener cada material. Desde el punto de vista de mejoramiento genético se buscan aquellos clones que sean estables de un ciclo a otro y con valores por encima de 14%,

Cuadro 2. Porcentaje de germinación de 28 materiales de caña de azúcar pertenecientes al primer ensayo replicado serie V98.

Clon	% Germinación	Clon	% Germinación
PR61-632	44,00	RB85-5546	31,67
V98-78	42,00	V64-10	31,33
V98-95	40,33	V98-15	31,33
V98-37	40,00	V98-119	31,00
V98-56	40,00	RB84-5257	29,33
V98-117	38,67	V98-87	28,67
RB85-5035	38,00	RB85-5536	28,67
V98-64	37,00	PR980	28,00
V98-120	37,00	V98-80	27,67
V98-13	35,33	V98-7	27,33
V98-10	33,33	V98-62	26,67
V98-39	32,67	C137-81	24,00
C266-70	32,33	V98-106	22,33
V98-33	32,00	CV	9,95
V98-35	31,67	DMS	5,37

para considerarlos aptos para la selección a la siguiente etapa.

Al analizar los datos obtenidos en los tres ciclos de evaluación (Figura 1) se pudo observar diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) entre variedades, resaltando la variedad C137-81 con un valor de 15,43% de Pol, para el ciclo planta seguida de la V98-95, V98-119 y V98-106 con valores por encima de 14,80%. Los testigos para este ciclo presentaron un promedio de 12,92%, por debajo del promedio de los materiales experimentales que estuvo en 13,77% de Pol, demostrando la calidad de los materiales en este ciclo.

Para el ciclo soca se observa cómo estos valores disminuyeron para casi todos los materiales, sin embargo, variedades como la V98-106, V98-7 y la V98-64, mantuvieron sus valores casi estables por encima de 14% de Pol. El promedio del ensayo para este ciclo bajó a 12,87%, no obstante, el de

los testigos se incrementó a 13,01%. Si analizamos el ciclo soca 2 esta variable disminuye a 12,33%, pero se observa, que materiales como la V98-106 se mantienen estables a través del tiempo.

Con respecto a la variable de TCH, el ensayo presentó un buen rendimiento promedio en el ciclo planta con 130,05; superior al de los testigos, resaltando cultivares como V98-62 y C266-70, con rendimientos superiores a 160 t ha⁻¹ (Cuadro 4). Cabe destacar que todos los materiales estuvieron por encima de las 100 t ha⁻¹.

En el ciclo soca, es normal que el rendimiento disminuya en algunas variedades, corroborándose con el promedio del ensayo en 120,58 t ha⁻¹. En este ciclo resaltan las variedades V98-62, V98-120 y V98-37, con valores por encima de los 160 t ha⁻¹. En el ciclo soca 2, se nota un marcado descenso para todas

Cuadro 3. Valores de correlación entra las variables de germinación y toneladas de caña por hectárea, para el primer ensayo replicado serie V 1998.

	Ger	TCH
Ger	-	0,45
TCH	0,15	-

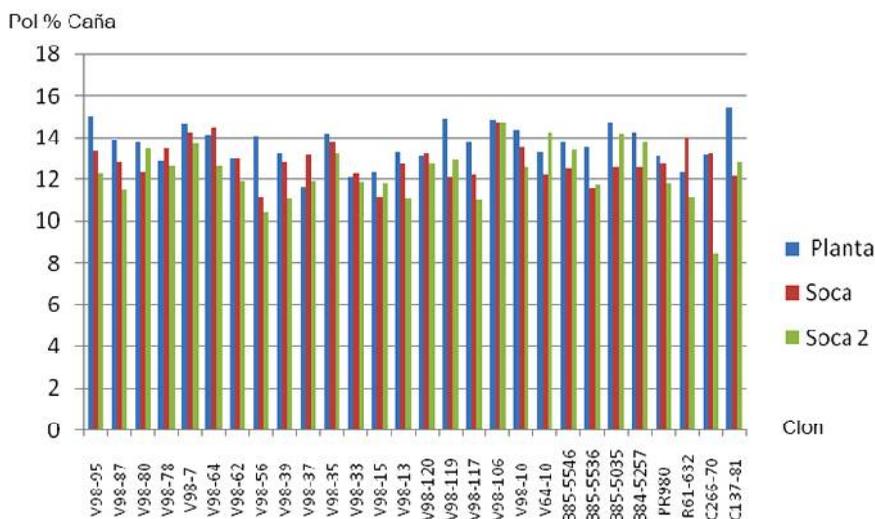


Figura 1. Valores de Pol % Caña, de 28 materiales del primer ensayo replicado, Serie V98 Para los tres ciclos de evaluación.

Cuadro 4. Variables tonelaje de caña por hectárea (TCH) y toneladas de Pol por hectárea (TPH), para tres ciclos del primer ensayo replicado serie V98.

Clon	TCH			TPH		
	Planta	Soca	Soca 2	Planta	Soca	Soca 2
C137-81	139,26	149,18	67,15	21,48	17,83	8,65
V98-95	114,07	98,81	50,22	17,03	13,23	6,22
V98-119	103,7	143,26	54,73	15,37	17,52	7,16
V98-106	106,66	104,74	68,27	15,98	15,56	9,52
RB85-5035	118,52	97,33	71,69	17,50	12,41	10,11
V98-7	122,96	92,89	69,28	18,03	13,13	9,26
V98-10	117,04	107,56	91,62	22,09	18,94	11,45
RB84-5257	112,59	66,22	20,68	15,99	8,12	2,84
V98-35	124,44	129,92	70,95	17,66	18,00	9,35
V98-64	124,45	131,40	86,63	17,61	19,05	10,96
V98-56	139,26	134,37	48,69	19,62	14,87	5,11
V98-87	106,67	129,93	54,96	14,89	16,58	6,35
V98-117	124,44	79,55	53,68	17,13	9,94	5,93
RB85-5546	128,89	61,78	29,49	17,88	7,65	3,91
V98-80	149,63	116,59	58,88	20,66	14,49	7,91
RB85-5536	130,37	109,18	57,68	17,66	12,57	6,79
V64-10*	117,04	107,56	67,78	15,43	13,42	9,73
V98-13	145,18	135,85	51,57	19,27	17,30	5,68
V98-39	139,26	149,19	87,06	18,52	19,16	9,69
C266-70	167,41	153,48	67,4	22,06	20,27	7,76
PR980*	114,08	122,52	60,82	14,65	15,67	7,11
V98-120	154,07	169,63	93,42	20,20	22,41	12,2
V98-62	160,00	174,37	121,41	20,95	22,71	14,37
V98-78	134,81	121,04	56,65	17,34	16,18	7,17
PR61-632*	131,85	143,26	75,33	16,23	20,11	8,52
V98-15	145,18	94,37	42,15	17,90	11,31	5,17
V98-33	118,52	86,96	51,97	14,41	10,68	6,25
V98-37	151,11	165,19	81,15	17,68	21,74	9,61
DMS	41,23	48,06	25,99	5,55	6,49	3,52
CV%	19,18	24,12	24,55	18,95	25,18	26,83
Promedio del ensayo	130,05	120,58	64,69	17,90	15,75	8,03
Promedio de testigos	120,99	124,45	67,98	15,44	16,4	8,45

*Testigos comerciales.

las variedades y esto se debió, probablemente, al manejo dado al ensayo para este ciclo; sin embargo, sigue resaltando la variedad V98-62, siendo la única que se mantiene por encima de las 100 t ha⁻¹ para los tres ciclos.

La variable TPH se refiere a la cantidad de azúcar (expresada en toneladas), obtenida por la cantidad de caña cosechada en una hectárea. Está relacionada directamente con el PPC y las toneladas de caña. En esta variable se presentaron diferencias significativas entre variedades para los tres ciclos en estudio.

En el ciclo planta resaltaron las variedades C266-70, V98-10, V98-62, V98-80 y V98-120 con valores que superan los 20 TPH (Cuadro 4). En el ciclo soca, a pesar de que los valores de TPH bajaron, variedades venezolanas como V98-62 y V98-120, superaron a las 22 TPH. En el último ciclo, los valores disminuyeron drásticamente debido a la producción de caña, pero igualmente la variedad venezolana V98-62, sigue resaltando como la más alta en rendimiento de TPH.

Al analizar estas tres variables para todos los ciclos (Figura 2), se observa como el PPC es el más estable durante los tres cortes, lo cual indica que es una variable con poca influencia del ambiente. Al contrario, se muestra la producción de caña o TCH, observándose que

es una variable con mucha influencia ambiental, mostrando la respuesta de las variedades afectadas por el efecto de ciclo.

El análisis combinado de los tres ciclos de cosecha (Figura 3), muestra diferencias significativas entre variedades para todas las variables evaluadas, resaltando las variedades V98-62 (1), V98-120 (2) y V98-10 (3), con los mejores TPH; la variedad V98-106 (13) con el mejor PPC y la V98-62 (1) con el mayor TCH.

Se consideran aptos para ser seleccionados a la siguiente etapa todos los materiales que estén por encima de las 15 TPH, ya que superan al mejor de los testigos que en este caso es la PR61-632. Sin embargo, a parte de los criterios de rendimiento hay otros factores como la presencia de enfermedades e insectos plaga que determina definitivamente la selección de una variedad.

De esta manera los materiales seleccionados para la etapa de ensayos regionales son: V98-62, V98-120, C266-70, C137-81 y V98-39, estos cultivares superaron a los testigos en la variable de TPH y fueron resistentes y medianamente resistentes al carbón de la caña de azúcar, además de presentar una buena apariencia general.

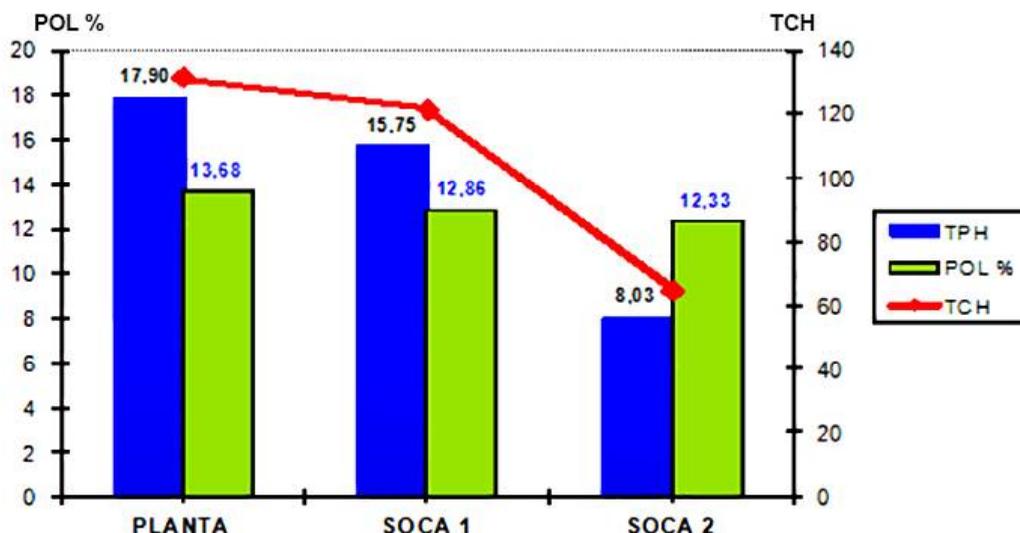


Figura 2. Variables TPH, PPC y TCH para los tres ciclos (planta, soca y soca 2) del primer ensayo replicado Serie V98.

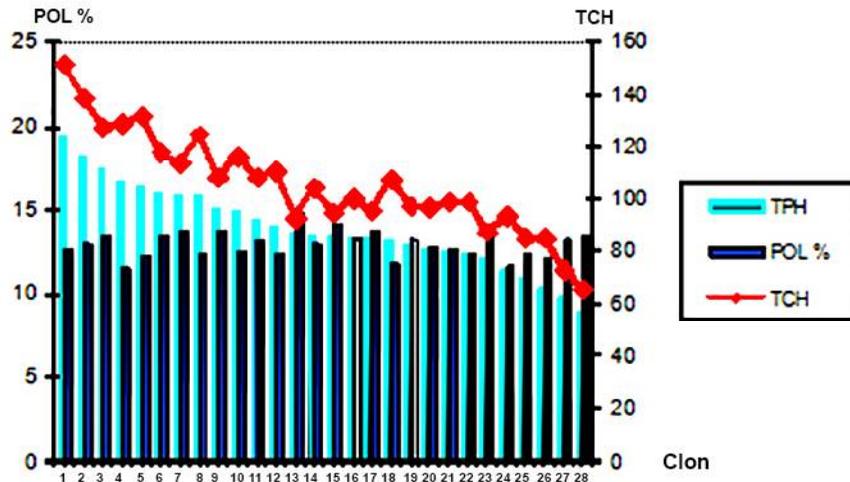


Figura 3 Análisis combinado de los tres ciclos de corte para las variables TPH, PPC y TCH, del primer ensayo replicado V98.

CONCLUSIONES

A medida que se va avanzando en las etapas tempranas del programa, la selección de los materiales se hace cada vez más estricta, teniendo en cuenta todos los criterios, tanto de rendimiento como de evaluación de enfermedades e insectos plagas.

Las variedades V98-78, V98-95, V98-56 y V98-37, fueron las que presentaron mejor brotación a los 45 días de sembrado el ensayo, sin tener esta incidencia en los rendimientos de caña por hectárea.

Los materiales que presentaron un rendimiento superior a los testigos y aceptable reacción a las principales enfermedades del cultivo fueron: V98-39, V98-62, V98-120, C266-70 y C137-81.

LITERATURA CITADA

- Cassalett Davia, C. y H. Ranjel Jiménez. 1995. Mejoramiento Genético. En: El cultivo de la caña de azúcar en la zona azucarera de Colombia, Cali. CENICAÑA. pp. 63-81.
- Chen, J. 1997. Manual del azúcar de caña: Para fabricantes de azúcar y químicos especializados. Editorial Limusa, S. A. México, D. F. 1200 p.
- De Sousa-Viera, R., R. Briceño, A. Díaz, R. Rea, M. Niño, A. Rivero, G. Aza, A. Ortiz y J. George. 2008. Programa Venezolano de Desarrollo de Variedades de Caña de Azúcar (PDVCA). Revista Digital INIA HOY N° 1 (enero-abril). Disponible en línea: <http://www.inia.gob.ve/index.php?option=com>, [Mar. 25, 2014].
- Latiegue, R. 2009. La fertilidad de los suelos de la Estación Local Yaritagua del INIA Yaracuy y su uso para el cultivo de la caña de azúcar. Revista Digital INIA HOY N° 4 (enero-abril). Disponible en línea: <http://www.inia.gob.ve/index.php?option=com>, [Mar. 25, 2014].
- Mendoza, S., G. Valera y C. Ohep. 1983. Estudio preliminar de suelos del eje Morón-Barquisimeto-La Lucía. Departamento de suelos. División de información e investigación del ambiente, Barquisimeto, 176 p.
- Netafim. 2014. Sugarcane. Sugarcane morphology/growth phases/ germination. Available online: http://www.sugarcanecrops.com/crop_growth_phases/germination_establishment_phase [Mar. 25, 2014].
- Smit, M. A. 2010. Characterising the factors that affect germination and emergence in sugarcane. Proc S Afr Sug technol ass. 83:230-234.
- Ramón, M. y C. Mendoza. 2002. Efecto del deterioro post-corte sobre la germinación de la semilla asexual de cinco variedades de caña de azúcar. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 19(4):264-272.

Efecto de diferentes dosis de extractos de plátano sobre el crecimiento de plantas *in vitro* del mismo cultivo en aclimatización

Effect of different doses of plantain extracts on the growth of *in vitro* plantlets in acclimatization of the same crop

Giomar G. Blanco Espinoza^{1*}, Blas A. Linares¹, Roberto P. Guédez Falconete², Julitt B. Hernández Fermín¹ y Carmen A. Rincón¹.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), estado Yaracuy. ²Ministerio del Poder Popular para la Agricultura Productiva y Tierras. *Correos electrónicos: gblanco@inia.gob.ve, gioma@hotmail.com

RESUMEN

La propagación *in vitro* es una alternativa para producir semillas sanas de plátano (*Musa* AAB); no obstante, es necesario mejorar la adaptación de las plantas *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Para ello, pueden aprovecharse los restos de cosecha del plátano como fuente de extractos promotores del crecimiento en el mismo cultivo, siendo necesario determinar la dosis adecuada que permita las mejores respuestas. Con este fin, se sembraron vitroplantas en recipientes plásticos de 295 ml que contenían tierra, estiércol y concha de arroz en proporción 1:0,5:0,5; bajo un diseño experimental completamente aleatorizado y arreglo factorial 2x4 (tipo de extracto y dosis), con seis repeticiones. Los extractos estudiados fueron: pseudotallos y láminas foliares de plátano en dosis de 0, 10, 30 y 100%. Se evaluó la altura, número de hojas, materia seca de la parte aérea y subterránea, longitud radical, tasa de fotosíntesis neta, transpiración, conductancia estomática y concentración de pigmentos fotosintéticos. Se encontró que la mejor dosis fue la del 10%, independientemente del tipo de extracto, la cual produjo incrementos hasta del 4233,33%, en las variables evaluadas con respecto al testigo. Se concluye que la dosis de 10% fue suficiente para desencadenar respuestas morfofisiológicas conducentes a mejorar la adaptabilidad de plantas *in vitro* de plátano en aclimatización. Sin embargo, es recomendable continuar los estudios para clarificar el mecanismo de acción de estos extractos sobre las respuestas morfoanatómicas, fisiológicas y bioquímicas manifestadas por esta especie durante su adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

Palabras clave: *Musa* AAB, Adaptación *ex vitro*, fotosíntesis, propagación *in vitro*.

Recibido: 22/04/14

ABSTRACT

In vitro propagation is an alternative to produce healthy plantain seeds (*Musa* AAB); however, it is necessary to improve the adaptation of plantlets to *ex vitro* conditions. As an option, the use of plantain crop residues allows the obtention of growth promoters in the same crop. However, it is necessary to determine the appropriate doses to trigger the best responses of the crop during acclimatization. For this purpose, plantlets were planted in plastic containers containing 295 ml of soil, manure and rice husk at a ratio of 1:0,5:0,5; under a completely randomized 2x4 factorial design (extract type and doses) with six replications. The extracts were pseudostems and leaf blades of plantain at doses of 0, 10, 30 and 100%. Height, number of leaves, dry matter of aerial and under ground parts, root length, net photosynthetic rate, transpiration, stomatal conductance and photosynthetic pigment concentration were evaluated. We found that the best dose was 10% regardless of the type of extract, which produced increases of up to 4233.33% in the evaluated variables relative to the control. It is concluded that the dose of 10% was sufficient to trigger morphophysiological responses to improve the adaptability of plantain plantlets during acclimatization; however, we recommend further studies to clarify the mechanism of action of these extracts and morphoanatomical, physiological and biochemical responses expressed by this species in their adaptation to new environmental conditions.

Key words: *Musa* AAB, *Ex vitro* adaptation, photosynthesis, *in vitro* propagation.

INTRODUCCIÓN

Las musáceas constituyen una de las seis familias en el orden Zingiberales. Cuenta con unas 1000 especies, entre ellas los bananos y plátanos, los cuales son miembros del género *Musa*. La importancia de estos cultivos va desde su alto valor nutritivo hasta su uso artesanal (Belalcázar *et al.*, 1991).

En Venezuela, la producción de musáceas es considerada de importancia económica, debido a que es comercializada a nivel nacional e internacional; además de ser un alimento de gran valor nutritivo. Sin embargo, al igual que en otros rubros, su producción está limitada por numerosos factores, entre los cuales está la disponibilidad de semillas sanas para el establecimiento de las plantaciones (Hernández y Zamora, 2001).

La propagación *in vitro* representa una opción para solventar la producción de semillas. Este proceso presenta sus dificultades sobre todo durante la fase de aclimatación, ya que las plantas deben adaptarse progresivamente a las condiciones de campo (Lezcano, 2008; Agramonte *et al.*, 1998), pudiendo ocurrir pérdidas alrededor del 25% (Acosta-Acosta y Galindo-Menéndez, 2013); lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas para mejorar la adaptación de las plantas *in vitro* a las condiciones *ex vitro*.

Dentro de estas alternativas surge el uso de extractos vegetales provenientes de restos de cosecha del cultivo. Se conoce que el plátano genera gran cantidad de materia fresca, la cual, una parte importante son residuos de cosecha. En este sentido Belalcázar *et al.* (1991) señalan que durante la cosecha sólo se aprovecha de 20 a 30% de la biomasa generada por la planta, quedando el 70 a 80% por utilizar.

Según, Mazzeo *et al.* (2010), esto ha generado una de las principales problemáticas ambientales en este sistema de producción, puesto que en la mayoría de los casos, los restos vegetales son incinerados o vertidos a los cauces receptores sin tratamiento previo, lo que incrementa la degradación del ecosistema.

En otros casos, los residuos son dejados dentro de la misma plantación, lo que si bien contribuye al reciclaje de nutrientes, también constituye un

reservorio para insectos plaga y enfermedades de importancia económica para el cultivo, tales como el gorgojo negro (*Cosmopolites sordidus*), el gorgojo rayado del plátano (*Metamasius hemipterus*) y la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*); además de entorpecer las labores del cultivo. Es por ello, que cada vez ha tomado más importancia el aprovechamiento de estos residuos de cosecha.

En tal sentido, la literatura reporta el uso de estos residuos en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico y alimentario (Granda *et al.*, 2005), así como en la elaboración de papel; y la obtención de harina y almidón (Mazzeo *et al.*, 2010).

En el país, además del aprovechamiento para la obtención de harinas y almidón (Hernández *et al.*, 2009), también es conocido el uso del pseudotallo (PS) de la planta para la alimentación del ganado durante la época de escasez de agua, la elaboración de artesanía y el aprovechamiento de las láminas foliares (LH) para la llamada hoja de hallaca, la cual es utilizada en la envoltura de este plato típico en la época decembrina (Hernández y Zamora, 2001).

Estudios realizados sobre extractos provenientes de raquis de plátano y de banano (*Musa* AAA) han demostrado un fuerte efecto antifúngico contra la sigatoka negra (Larco, 2004; Ortiz, 2009) y antibacterial sobre *Ralstonia solanacearum* causante del Moko o Hereque. Garcés (2010), comparando la calidad y los efectos de lixiviados obtenidos a partir de raquis de banano y plátano mediante transformación aeróbica y anaeróbica, reportó que ambos extractos en dosis del 100% incrementaron la altura en plantas *in vitro* de banano 'Williams'.

Russo *et al.* (1995) reportan que extractos húmicos de raquis de banano (*Musa* AAB 'Cavendish') incrementaron el crecimiento en plantas del mismo cultivo. Sin embargo, poco se sabe del efecto de extractos provenientes de otros residuos de plátano, tales como PS y LH, y de la dosis a la cual deben ser aplicados los mismos.

El propósito de esta investigación fue evaluar el efecto de la dosis de extractos provenientes de PS y LH de plátano sobre el desarrollo de plantas *in vitro* del mismo cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en los laboratorios y cobertizo de la Unidad de Biotecnología Agrícola del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP); Maracay, estado Aragua.

Obtención de las plantas *in vitro*

Para la propagación *in vitro* se siguió el protocolo establecido por el Instituto de Biotecnología de Plantas de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas, Cuba (2005); para ello, se utilizaron como explantes ápices de plátano ‘Hartón’ (*Musa* AAB) obtenidos de plantas provenientes del banco de germoplasma del INIA-CENIAP, los cuales fueron colocados en un medio de cultivo conformado por sales propuestas por Murashige y Skoog (1962), con adición de auxinas y citocininas de acuerdo a la fase del cultivo *in vitro*: 6-bencilaminopurina (6-BAP) 2 mg l⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB)

0,023 mg l⁻¹ (fase de establecimiento o iniciación), 6-BAP 3 mg l⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 1 mg l⁻¹ (fase de multiplicación) y AIA 1,3 mg l⁻¹ (fase de enraizamiento).

La fase de enraizamiento permitió homogeneizar la población de plantas *in vitro*, tanto en tamaño como en su estado fisiológico. Sin embargo, una vez obtenidas las plantas, fueron lavadas con agua para la eliminación de restos de medio de cultivo y se les eliminó las raíces para evitar enmascaramiento de los resultados, considerando solo las que se formen durante esta fase. Posteriormente, las plantas se sembraron en recipientes plásticos de 295 ml de capacidad, que contenían sustrato estéril compuesto de una mezcla de tierra, estiércol y conchas de arroz en proporción de 1:0,5:0,5; y cuya composición química fue determinada en el Laboratorio de suelos, agua y plantas del INIA Yaracuy (Cuadro 1).

Las plantas crecieron bajo condiciones de 80% de sombra dentro de un cobertizo por 75 días.

Cuadro 1. Composición química del sustrato utilizado para la aclimatización de las plantas *in vitro* de plátano (*Musa* AAB).

Análisis químico del sustrato		
	pH	6,4
	C.E. (dS/m a 25°C)	2,70
	Materia orgánica (%)	29,00
Macroelementos	N (%)	0,84
	P (%)	1,19
	K (%)	0,26
	Ca (%)	0,84
	Mg (%)	0,19
Microelementos	Fe (mg kg ⁻¹)	5443,10
	Cu (mg kg ⁻¹)	72,0
	Zn (mg kg ⁻¹)	97,3
	Mn (mg kg ⁻¹)	490,80

Nota: Para pH y C.E. se utilizó una relación de muestra 1:5. El método de extracción de todos los elementos fue con solución nitro-perclórica, excepto nitrógeno (N) para el cual se utilizó el método Kjeldahl. El calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe) y manganeso (Mn), fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica, y fósforo (P) y azufre (S) por fotocolorimetría.

Características de los extractos de plátano utilizados

Los extractos usados fueron los obtenidos y caracterizados por Blanco (2014), quien utilizó el modelo diseñado por Linares (2009) basado en el uso de recipientes plásticos de 40 litros con tapa, donde se colocaron restos de cosecha

de plátano (PS o LH) durante 90 días, para su descomposición y producción de lixiviados. La cantidad de materia fresca (MF) utilizada fue la necesaria para llenar por completo la capacidad de los recipientes (40 litros), 10 kg en el caso de PS y 5,5 kg para LH. Las características químicas y microbiológicas de los extractos producidos se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características químicas y microbiológicas de extractos provenientes de pseudotallos y láminas foliares de plátano (*Musa AAB*).

Características		Tipo de lixiviado		
		Pseudotallo	Lámina foliar	
Química	pH	7,90	7,90	
	C.E. (dS/m a 25 °C)	7,65	11,80	
Macroelementos	N (%)	0,01	0,02	
	P (%)	0,01	0,0033	
	K (%)	0,17	0,24	
	Ca (%)	0,02	0,04	
	Mg (%)	0,01	0,02	
Macroelementos	Fe (mg kg ⁻¹)	4,63	3,73	
	Cu (mg kg ⁻¹)	0,24	0,27	
	Zn (mg kg ⁻¹)	0,30	0,41	
	Mn (mg kg ⁻¹)	1,12	2,74	
Microorganismos no patogénicos	<i>Bacillus</i> sp (U.F.C./ml)	1x10 ⁶ - 3x10 ¹¹	2,2x10 ⁵ - 5x10 ¹¹	
Inocuidad	<i>Salmonella</i> (en 25 ml de muestra)	Ausente	Ausente	
	Coliformes totales	Ausente	Ausente	
	<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente	
Otros compuestos	Proteínas (µg ml ⁻¹)	36,00 - 128,00	15,85 - 55,40	
	Ácido fúlvicos (%)	0	0,35	
	Ácidos húmicos (%)	0	0,06	
	Metabolitos secundarios	Fenoles, flavonoides, antroquinonas, alcaloides, terpernos y esteroides		Saponinas, fenoles, flavonoides, antroquinonas, alcaloides, terpernos y esteroides
Otras características	Color	Marrón	Marrón	

Para determinar la composición de macro y microelementos se utilizó el método de extracción con solución nitro-perclórica, excepto nitrógeno para el cual se utilizó el método Kjeldahl. Las concentraciones de calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe) y manganeso (Mn), fueron cuantificadas por espectrofotometría de absorción atómica, y la de fósforo (P) y azufre (S) por fotocolorimetría. Para proteínas totales se utilizó la técnica de microensayos descrita por Bradford (1976). Los metabolitos secundarios fueron determinados utilizando cromatografía de papel (Marcano y Hasegawa, 2002). Para la concentración de *Salmonella* se utilizó el método de análisis FONDO NORMA 1291-04) y para coliformes totales y *Escherichia coli* el método establecido por COVENIN 3276-97. La concentración de ácidos húmicos y fúlvicos fue determinada en el Laboratorio comercial SEDICOMVET, C.A. (Rif J-30590770-6; NIT 0054330707), mediante el método de Walkley-Black (1934).

Diseño experimental y arreglo de tratamientos

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado en arreglo factorial 2x4 con seis repeticiones, donde el primer factor corresponde al tipo de extracto (PS o LH) y el segundo a las dosis aplicadas (0, 10, 30 y 100%). La dosis de los extractos fueron calculadas considerando que el extracto original obtenido tiene una concentración del 100%, a partir del cual se hicieron diluciones con agua para obtener las restantes (10 y 30%). La dosis de 0% se corresponde a plantas no tratadas con los extractos. Se aplicaron 20 ml del extracto por cada planta con una frecuencia de 2 veces por semana.

VARIABLES EVALUADAS

Morfológicas: Al final del período de aclimatización (75 días), se evaluaron las variables morfológicas en las plantas *in vitro* cultivadas: altura de la planta (cm), medida desde la base del PS hasta el punto de inserción de la hoja bandera; número de hojas, área foliar (AF; cm²), para lo cual se utilizó un medidor de AF CI-202, CID, Inc. La parte subterránea (cormo + raíces) fue separada del PS de las plantas y lavadas para medir la longitud radical (LR; cm) en las raíces principales emergidas directamente del cormo, utilizando una regla graduada. Posteriormente, se secaron en estufa a 70 °C por 48 h y se determinó materia seca (MS) de la parte aérea y la parte subterránea (g).

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas al final de la aclimatización.

Fisiológicas: Se midió la tasa de fotosíntesis neta (P_n) expresada en μmol m⁻² s⁻¹; además de la transpiración (E) y la conductancia estomática (C), ambas en mmol m⁻² s⁻¹, sobre la hoja más joven recientemente expandida de cada vitropianta, para lo cual se utilizó un sistema portátil de medición Hand-Held Portable Photosynthesis System (CID, INC, U.S.A).

Las clorofilas **a** y **b** fueron extraídas por el método de Hiscox e Israelstam (1979), y se midió la absorbancia a 663 y 645 nm, para determinar su concentración mediante las expresiones propuestas por Arnon (1949):

Concentración de clorofila **a** = $0,0127\lambda 663 - 0,00269\lambda 645$ (mg ml⁻¹)

Concentración de clorofila **b** = $0,0229\lambda 645 - 0,00468\lambda 663$ (mg ml⁻¹)

La clorofila total se determinó como la suma de las concentraciones de clorofila **a** y clorofila **b**. Los resultados fueron expresados con base a la MF.

Análisis de los resultados

Los resultados fueron analizados utilizando el programa Infostat®, a través del cual se efectuaron las pruebas estadísticas de normalidad, análisis de varianza y, en caso de detectar diferencias estadísticas entre tratamientos, la prueba de medias de Tukey con un nivel de significación del 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VARIABLES MORFOLÓGICAS

En las Figuras 1 y 2, se representan las variables altura y número de hojas, respectivamente, en función del tipo de extracto (A) y dosis aplicada (B). El análisis estadístico detectó diferencias significativas para estas variables sobre ambos factores, sin detectar diferencias para las interacciones entre los mismos.

Las plantas *in vitro* tratadas con extractos provenientes de PS fueron 1,23 veces más altas y con un número de hojas ligeramente superior que aquellas tratadas con extractos de LH (Figuras 1A y 2A), lo que indica una mayor efectividad de este extracto para promover el crecimiento a través del incremento de estas variables comparado con el de LH.

En cuanto al factor dosis, se observa que todas tuvieron un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas *in vitro* de plátano superando al testigo (0%); sin embargo, con la aplicación del 10% se obtuvo el mejor comportamiento de la altura de la planta y número de hojas (Figuras 1B y 2B, respectivamente), las cuales tendieron a disminuir al incrementar la concentración de los extractos. Estos resultados pudieran estar reflejando que el efecto de estos extractos vegetales tienen un comportamiento similar al mostrado por los nutrimentos, los cuales

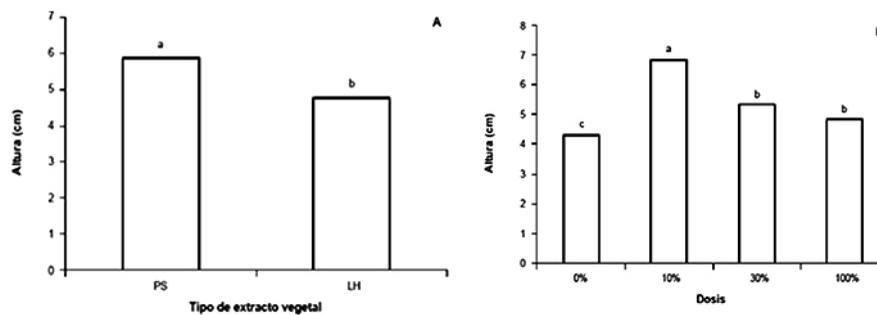


Figura 1. Efecto del tipo de extracto (A) y dosis (B) sobre la altura (cm) en plantas *in vitro* de *Musa* AAB tratadas con extractos de pseudotallos (PS) y láminas foliares (LH) durante la fase de aclimatación.

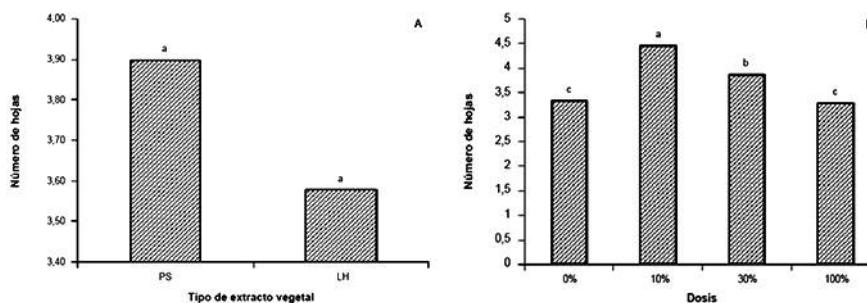


Figura 2. Efecto del tipo de extracto (A) y dosis (B) sobre el número de hojas (NH) en plantas *in vitro* de *Musa* AAB tratadas con extractos de pseudotallos (PS) y láminas foliares (LH) durante la fase de aclimatación.

alcanzan una dosis óptima de aplicación (Espinosa y Mite, 2012).

En el caso de la variable MS de la parte aérea, el análisis estadístico detectó diferencias significativas para los factores: tipo de extracto y dosis. El extracto de LH produjo un incremento del 33,33% en el valor de la variable antes mencionada, comparado con el proveniente de PS (Figura 3A).

En cuanto al factor dosis, se obtuvo que en todos los casos donde se aplicó el extracto (10, 30 y 100%), los valores para esta variable fueron superiores comparados con el testigo (0%). Sin embargo, al realizar una comparación entre

ellas, se observa que la dosis del 30% produjo el mayor incremento de la MS de la parte aérea (75%) en plantas tratadas, seguida de las dosis de 10 (54,17%) y del 100% (50%), con respecto al testigo (Figura 3B).

Respecto a las variables AF, LR y MS de raíces, el análisis estadístico detectó diferencias significativas para los factores tipo de extracto y dosis, al igual que para la interacción entre ambos. En el Cuadro 3 se observa que la mejor respuesta para las variables AF, LR y MS radical, se obtuvo cuando las plantas fueron tratadas con extractos provenientes de PS a la dosis de 10%, las cuales superaron al testigo en un 326,99; 530,55 y 4233,33%, respectivamente.

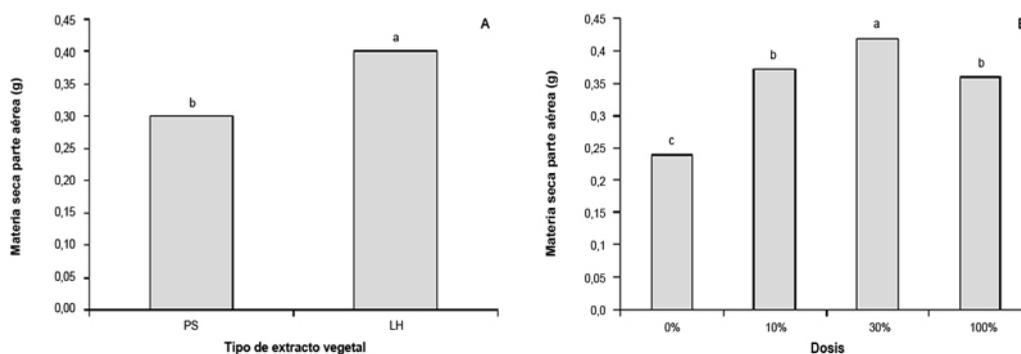


Figura 3. Efecto del tipo de extracto (A) y dosis (B) sobre la materia seca de la parte aérea en plantas *in vitro* de *Musa AAB* durante la fase de aclimatización. PS pseudotallos y LH láminas foliares.

Sin embargo, se puede apreciar que ambos extractos aplicados en las diferentes dosis estudiadas (10, 30 y 100%), produjeron incrementos en los valores de las variables analizadas que superaron en todos los casos al tratamiento testigo (0%), lo que demuestra la efectividad de estos extractos vegetales sobre el crecimiento en plantas *in vitro* de plátano.

Los resultados coinciden con el estudio realizado por Russo *et al.* (1995), quienes reportan el efecto favorable de un bioestimulante extraído del raquis de banano (*Musa AAA*, grupo “Cavendish”, cultivar Gran enano) sobre el AF y MS radical.

En el caso de la sobrevivencia de las plantas durante la aclimatización, a pesar de que los valores alcanzados por esta variable son menores, en algunos casos, a los reportados por la literatura (Acosta-Acosta y Galindo-Menéndez, 2013), podría estar asociado a la eliminación de las raíces previo al trasplante; además se pudo observar un efecto positivo de los extractos evaluados (Cuadro 3), evidenciado en el incremento de esta variable en un 30% respecto a las plantas no tratadas; siendo las dosis de 10 y 30% las que contribuyeron a la mayor adaptabilidad de las mismas en condiciones *ex vitro*.

Variables fisiológicas

En el Cuadro 4, se presentan las variables Pn, E, C y concentración de pigmentos fotosintéticos:

clorofila a (Chla), b (Chlb) y total (Chla+Chlb) en LH de plantas *in vitro* de *Musa AAB* en función de los factores: tipo de extracto y dosis.

Las dosis aplicadas provocaron diferencias altamente significativas sobre Pn, sin diferencias en cuanto al tipo de extracto utilizado. La aplicación de los extractos a cualquiera de las dosis evaluadas (10, 30 y 100%) incrementó el valor de esta variable con respecto al testigo (0%).

En el caso de E, no hubo diferencia significativa para ninguno de los factores analizados; pero sí para la variable C en relación con el tipo de extracto y dosis. Se obtuvo que plantas tratadas con extractos de PS mostraran una C mayor; es decir, mayor intercambio de gases [entre ellos, el dióxido de carbono (CO₂)] que aquellas tratadas con extracto de LH.

Por otra parte, la dosis del 10% favoreció en un 54,65% el incremento de esta variable con respecto al testigo (dosis 0%). Sin embargo, al comparar los valores de esta variable con los de fotosíntesis, se observó que los valores más altos encontrados no coinciden con los valores más altos de Pn, lo que hace pensar que durante la fase de aclimatización de las plantas de plátano, la aplicación de los extractos vegetales, podría estimular otros factores que contribuyan al incremento en la fotosíntesis, entre los cuales sería interesante considerar la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa).

Cuadro 3. Área foliar (AF), longitud radical (LR), materia seca de la parte subterránea (PSR) y sobrevivencia en plantas *in vitro* de *Musa* AAB tratadas con extractos de pseudotallos y láminas foliares de plátano a diferentes dosis.

Tipo de extracto	Dosis	AF (cm ²) (*)	LR (cm) (*)	PSR (g) (*)	Sobrevivencia (%)
Pseudotallo	0%	14,19 c	7,07 c	0,003 c	66,67
	10%	60,59 a	44,58 a	0,13 a	83,34
	30%	30,03 bc	10,17 c	0,02 b	80,00
	100%	49,13 ab	27,40 b	0,02 b	73,00
Lámina foliar	0%	14,19 c	7,07 c	0,003 c	66,67
	10%	34,52 abc	15,93 c	0,03 b	86,67
	30%	21,53 bc	8,45 c	0,01 b	83,34
	100%	21,87 bc	9,60 c	0,01 b	76,50

(*) Diferencias significativas entre tratamientos

Medias con la misma letra en la columna, son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha=0,05$).

Cuadro 4. Tasa de fotosíntesis neta (Pn), transpiración (E), conductividad estomática (C) y concentración de clorofila a (Chla), b (Chlb) y total (Chla+Chlb) en láminas foliares de plantas *in vitro* de *Musa* AAB tratadas, con diferentes dosis de extractos de pseudotallos y láminas foliares.

Factor	Pn ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	C ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	[Chla] ($\text{mg g}^{-1} \text{MF}$)	[Chlb] ($\text{mg g}^{-1} \text{MF}$)	[Chla+Chlb] ($\text{mg g}^{-1} \text{MF}$)
Tipo de extracto			(*)			
Pseudotallo	2,48	0,50	47,67 a	0,10	0,05	0,15
Lámina foliar	2,19	0,40	32,23 b	0,11	0,04	0,15
Dosis						
0%	1,07 b	0,50	34,00 b	0,08	0,03	0,11
10%	2,59 a	0,53	52,58 a	0,09	0,06	0,15
30%	3,26 a	0,38	35,17 b	0,14	0,05	0,19
100%	2,43 a	0,38	38,03 ab	0,10	0,04	0,14

Diferencias significativas entre tratamientos. Medias con la misma letra en la columna, son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha=0,05$). MF= Materia fresca.

Se conoce que el plátano es una especie de mecanismo fotosintético C3; no obstante, durante la aclimatización se reportó incrementos en la actividad de la PEP carboxilasa, que pudiera estar asociada a su vez a la síntesis de

almidón durante el proceso fotosintético (Aragón *et al.*, 2010).

En la concentración de pigmentos fotosintéticos no hubo diferencias estadísticas entre los factores estudiados (tipo de extracto y dosis). Aunque, en el caso del factor dosis se observó que la

concentración de Chla a y Chla+Chlb fue mayor en la dosis de 30%; produciendo incrementos hasta en un 75% en la concentración de Chla; de 100% en Chlb, hasta 72,73% en el caso de Chla+Chlb, comparadas con el testigo (dosis 0%).

Garcés (2010) reporta que el uso de lixiviados de banano y plátano obtenidos mediante fermentación anaeróbica de raquis, influyen positivamente sobre el contenido de clorofila en plantas *in vitro* de banano Williams.

El comportamiento observado en las variables fotosintéticas, donde se evidenció un incremento en Pn y de clorofilas en plantas tratadas, contribuye a la mayor adaptabilidad a las condiciones *ex vitro* y, por lo tanto, en el mayor porcentaje de sobrevivencia (Cuadro 3).

En términos generales, el efecto positivo de los extractos evaluados sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de plátano, puede ser atribuido a sus características químicas y microbiológicas (Cuadro 2). Estos extractos contienen macro y microelementos esenciales para las plantas, donde, más que la concentración de los mismos, realza la disponibilidad de estos nutrimentos para la planta, lo que está relacionado con su pH cercano a la neutralidad.

Por otro lado, los valores de conductividad eléctrica descartan la posibilidad de problemas de salinidad con la aplicación de estos extractos al suelo con su consecuente desbalance osmótico en la planta. Estos extractos contienen también proteínas, las cuales aportan aminoácidos que pueden incorporarse directamente al metabolismo de la planta.

Los aminoácidos, además de una función nutricional, pueden actuar como reguladores del transporte de microelementos, ya que pueden formar complejos con metales en forma de quelatos. La principal ventaja del uso de aminoácidos libres en la fertilización, es que al ser absorbidos rápidamente por la planta, son utilizados inmediatamente sin requerir mayores transformaciones (Albuja *et al.*, 2011).

Otros componentes pueden estar influyendo sobre la respuesta de crecimiento y de adaptación de las plantas *in vitro*, es la presencia de los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos evaluados; los mismos contienen flavonoides, alcaloides y fenoles, que parecen estar asociados a la

absorción de nutrimentos, síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis, componentes estructurales y efectos aleloquímicos. En el caso de los flavonoides, actúan como catalizadores en la fase fotoquímica de la fotosíntesis y como reguladores de los canales de iones envueltos en la fosforilación (Stalikas, 2007).

Por otra parte, aunque los extractos evaluados (PS y LH) difieren en cuanto a la presencia de saponinas, estas reducen la tensión superficial fungiendo como surfactantes que ayudan a su absorción en la planta. Además, contienen ácidos húmicos, los cuales, también poseen auxinas y precursores de su síntesis o actividad.

Otra característica, no menos importante para las plantas, es la presencia de bacterias del género *Bacillus*, dado que se ha reportado que bacterias de este género ejercen una acción específica mediante la producción de metabolitos secundarios y resistencia a estrés bióticos y abióticos, facilitando la toma de nutrientes del suelo (Calvo y Zúñiga, 2010) y como promotoras del crecimiento en algunos cultivos (Idriss *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se comprueba el efecto promotor del crecimiento que los extractos provenientes de PS y LH de plátano 'Hartón' ejercen sobre plantas *in vitro* de *Musa* AAB, durante la fase de aclimatización y que la dosis del 10% es suficiente para desencadenar respuestas morfológicas y fisiológicas conducentes a mejorar la adaptabilidad de las plantas durante esta fase de la propagación *in vitro*.

Se recomienda continuar los estudios para clarificar el mecanismo de acción de estos extractos y profundizar en las respuestas morfoanatómicas, fisiológicas y bioquímicas manifestadas por esta especie durante su adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

AGRADECIMIENTO

Al personal de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT), Unidad de Biotecnología Agrícola del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) y la sede del Instituto

Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicada en Yaracuy. Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el financiamiento; a la señora Juana Aguilar y demás productores de musáceas del estado Yaracuy; a los colegas Luis Castro, María Torrealba y los señores Sabino Morales y Walter Williams, por el apoyo en la realización de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Acosta-Acosta, E. y L. Galindo-Menéndez. 2013. Efecto de diferentes tiempos e intensidades luminosas y dosis de BIOBRAS-16 al 0,01 mg l⁻¹, en plantas *in vitro* de banano (*Musa spp.* cv. FHIA-18) en la fase de aclimatización. Innovación Tecnológica, (Número Especial), ISSN: 1025-6504. 19:9.
- Agramonte, D., D. Ramírez, M. Pérez, O. Gutiérrez, J. Pérez y M. Núñez. 1998. Manejo integrado de plantas *in vitro* en la fase de aclimatización. Programa y Resúmenes. XI Seminario Científico del INCA. Cultivos Trop. La Habana. 115 p.
- Albuja, R.; P. Araujo y A. López. 2011. Obtención de un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de *Spirulina platensis*, mediante degradación anaerobia. Boletín Técnico del Departamento de Ciencias de la Vida, Ing. en Biotecnología, Sangolquí, Ecuador. 20 p. Disponible en línea <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5015/2/T-ESPE-033046-A.pdf>. [Jun. 22, 2012].
- Aragón, C., M. Escalona, R. Rodríguez, M. Cañal, I. Capote, D. Pina and J. González-Olmedo. 2010. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 46:89-94.
- Arnon, D. I. 1949. Cooper enzymes in insolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology.* 24(1):1-15.
- Belalcázar, C., J. Valencia y J. Lozada. 1991. La planta y el fruto. In: Belalcázar, S. (ed). El cultivo del plátano en el trópico. Manual de Asistencia Técnica No. 50. ICA, Armenia, Quindío, INIBAP. Feriva. Cali, Colombia. pp. 45-89.
- Blanco, G. 2014. Respuesta morfofisiológica asociada al mecanismo de acción de extractos vegetales de plátano 'Hartón' sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de *Musa AAB* durante la aclimatización. Tesis Doctoral en Biotecnología Agrícola mención Vegetal. Maracay, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT). 117 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* 72:248-254.
- Calvo, P. y D. Zúñiga. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada.* 9(1):31-39.
- Espinosa, J. y F. Mite. 2012. Búsqueda de eficiencia en el uso de nutrientes en banano. International Plant Nutrition Institute. Disponible en línea: [http://nla.ipni.net/articles/NLA0081-EN/\\$FILE/Eficiencianutrientes.pdf](http://nla.ipni.net/articles/NLA0081-EN/$FILE/Eficiencianutrientes.pdf). [Jun. 22, 2012].
- Garcés, H. 2010. Comparación de la calidad y efectos de lixiviados obtenidos a partir de raquis de banano (*Musa acuminata*) y plátano (*Musa balbisiana*) mediante transformación aeróbica y anaeróbica en condiciones de invernadero. Trabajo de grado para la obtención del título de Ingeniero Agropecuario, Escuela Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil, Ecuador. 133 p.
- Granda, D., A. Mejía y G. Jiménez. 2005. Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *VITAE.* 12(2):13-20.
- Hernández, J. y S. Zamora. 2001. Desarrollo rural sostenible para las zonas productoras de plátano del estado Yaracuy. INIA-Secretaría de Desarrollo Agrícola de la Gobernación del estado Yaracuy. 158 p.
- Hernández, J., A. Cañizares, G. Blanco, I. Arrieche, A. Pérez, C. Salazar y M.

- González. 2009. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en harinas de clones de musáceas comestibles (*Musa* spp.). Revista UDO Agrícola. 9(2):499-457.
- Hiscox, J. y G. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. National Research Council of Canadá. pp. 1332-1334.
- Idriss, E., O. Makarewicz, A. Farouk, K. Rosner, R. Greiner, H. Bochow, T. Richter and R. Borriss. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology. 148:2097-2109.
- Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas. 2005. Protocolo para la micropropagación de cultivares de plátano y bananos mediante organogénesis. Cuba. 31 p.
- Larco, E. 2004. Desarrollo y evaluación de lixiviados de compost y lombricompost para el manejo de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), en plátano. Tesis de grado Magíster Scientiae. Escuela de Posgraduados, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. 77 p.
- Lezcano, M. 2008. Micropropagación masiva de plantas: El proceso innovador de la Biofábrica. CINNTEC, revista digital de innovación tecnológica. N° 3. Disponible en línea: http://www.cinntec.misiones.gov.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=17&Itemid=23. [Abr. 28, 2012].
- Linares, B. 2009. Informe de seguimiento técnico anual del proyecto "Fortalecimiento de cadenas de valor de plátano: Innovaciones tecnológicas para reducir agroquímicos", caso Venezuela. FONTAGRO-INIA Yaracuy, Venezuela. 10 p.
- Marcano, D. y M. Hasegawa. 2002. Fotoquímica orgánica. Segunda edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Editorial Torino. Caracas, Venezuela. 588 p.
- Mazzeo, M., L. León, L. Mejía, L. Guerrero y J. Botero. 2010. Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el Departamento de Caldas. Revista Educación e Ingeniería. (9):128-139.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15(3):473-497.
- Norma, Venezolana COVENIN N° 3276-97. 1997. Alimentos. Recuento de Coliformes y de *Escherichia coli*. Método en placa con películas secas rehidratables (Petrifilm). 7 p.
- Norma Venezolana COVENIN N° 1291-04. 2004. Determinación de *Salmonella shigella*. Aislamiento e identificación de Salmonella en alimentos. (1a. Revisión). Caracas, Venezuela: Ministerio de Fomento. 35 p.
- Ortiz, M. 2009. Evaluación de la actividad de los lixiviados de raquis de banano (*Musa* AAA), plátano (*Musa* AAB) y banano Orito (*Musa* AA) sobre el agente causal de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en condiciones *in vitro*. Trabajo de grado Ingeniera Agropecuaria. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 110 p.
- Russo, R., J. Lugo, O. Arreola y O. Arango. 1995. Efecto de un bioestimulante húmico extraído del raquis de banano (pinzote) sobre el crecimiento de plántulas de banano (*Musa* AAB subgrupo Cavendish clon Gran enano). Agronomía Mesoamericana. 6:130-133.
- Stalikas, C. 2007. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. V. Sep. Sci. 30:3268-3295.
- Walkley, A. and I. A. Black. 1934. An Examination of Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. Soil Sci. 37:29-37.

Radiaciones ionizantes para inducción de mutaciones en *Musa* AAA para la tolerancia a sequía

Ionizing radiation for mutation induction in *Musa* AAA for drought tolerance

Efrain Salazar^{1*}, Iselen Trujillo², Luís Castro¹, Elba Vallejo¹ y María Torrealba¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Unidad de Biotecnología Agrícola. INIA-CENIAP. ²Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Instituto de Desarrollo Científico y Tecnológico, IDECYT. *Correo electrónico: efra63@gmail.com

RESUMEN

Las musáceas tienen gran importancia nutritiva, socioeconómica y cultural; las explotaciones comerciales del rubro se ven severamente afectadas por la falta de agua. Los prolongados períodos de sequía han ocasionado el abandono del cultivo debido a la alta inversión que conlleva su riego. Para apoyar el desarrollo sustentable de comunidades rurales y favorecer el cultivo de musáceas es necesario contar con materiales tolerantes a sequía. El mejoramiento genético tradicional es dificultoso debido a la esterilidad de la mayoría de los genotipos comerciales; la inducción de mutaciones es una herramienta valiosa para tal fin, por ello es necesario determinar condiciones para obtener materiales tolerantes a sequía mediante su uso. Se estableció la dosimetría a través del uso de yemas axilares de *Musa* AAA cultivadas *in vitro*, el medio de selección determinó la DL50 con PEG 8000. Se obtuvo *in vitro* la generación M1V6, las plantas regeneradas a partir de yemas irradiadas se caracterizaron morfológica y anatómicamente, comparándolas con plantas regeneradas *in vitro* provenientes de yemas no irradiadas. Las plantas irradiadas presentaron una morfología foliar variada y diferente de las plantas no irradiadas, un porte más vigoroso, una anatomía foliar con mayor densidad de cloroplastos y mejor organización del parénquima esponjoso. Las plantas provenientes de yemas irradiadas mantuvieron su vigor y coloración al ser sometidas a condiciones simuladas de estrés hídrico, mientras que las plantas provenientes de yemas no irradiadas mostraron síntomas evidentes de estrés al tercer día de permanecer en condiciones de sequía simulada.

Palabras clave: mutaciones inducidas, cultivo *in vitro*, mejoramiento genético, tolerancia a la sequía.

ABSTRACT

Musa has great economical, nutritional, social and cultural importance. Commercial exploitations are severely affected by the lack of water, given the long drought periods that may occur. This situation has caused the abandonment of the crop due to the high investment for the implementation of irrigation. In order to support sustainable development of rural communities and favoring the production of *Musa*, it is necessary to produce drought tolerant *Musa* genotypes. Traditional breeding is difficult due to the sterility of most commercially grown genotypes. Mutation's induction is a valuable tool for such goal, being necessary to establish the conditions to obtain the drought tolerant plants with this technology. Dosimetry using *in vitro* grown *Musa* AAA buds, and the selection method using PEG 8000 were established, estimating the LD50. M1V6 generation was obtained *in vitro* and regenerated plants from irradiated buds were morphologically and anatomically characterized, and they were compared to plants regenerated from non-irradiated tissues. Irradiated plants had varied leaf morphology but different from non-irradiated plants. Also, they were more vigorous, and had a leaf anatomy with higher chloroplast density and a better organization of spongy parenchyma. Plants from irradiated buds kept their vigor and leaf color when exposed to simulated water stress conditions, while plants from non-irradiated buds showed evident symptoms of stress after the third day under simulated drought conditions.

Key words: induced mutations, *in vitro* culture, plant breeding, drought resistance.

Recibido: 24/04/14

INTRODUCCIÓN

El déficit hídrico es un proceso complejo y generalmente poco entendido, que afecta a una alta proporción de la población mundial, y ha presentado una tendencia a incrementarse de manera irregular a través del tiempo y el espacio, con efectos acumulativos y residuales (Wilhite, 2000). Cuando éste déficit se asocia con altas temperaturas, baja humedad relativa y alta radiación solar, características típicas de los países latinoamericanos y del Caribe, aumentan los niveles de evaporación y transpiración y, por tanto, aumenta el déficit de humedad en el suelo e impide y limita el crecimiento de cultivos, con la consecuente merma en la producción agrícola (Quiring y Papakryiakou, 2003; Wu *et al.*, 2004; Narasimhan y Srinivasan, 2005).

Por otro lado, la tendencia mundial de crecimiento poblacional aumenta la demanda de alimentos y bienes de primera necesidad, por lo que cada día es más apremiante el incremento de los rendimientos de la producción en las zonas actualmente cultivadas, así como, la adaptación de nuevas áreas al proceso agrícola (Chaves y Davies, 2010). En este sentido, las alteraciones climáticas asociadas a los cambios globales que se han producido en los últimos años, parecen afectar considerablemente el régimen pluviométrico en muchos países del área, generando como consecuencia una mayor frecuencia de eventos de sequías severas y prolongadas. Por lo tanto, la capacidad de producir alimentos en condiciones de baja suplencia de humedad se convierte en una necesidad prioritaria para los países latinoamericanos y del Caribe (Schaper *et al.*, 2000; Conde-Álvarez y Saldaña-Zorrilla, 2007).

En el caso de *Musa*, una de las principales limitantes que se han identificado para impulsar el cultivo de musáceas entre pequeños y medianos productores, así como productores de subsistencia, es la incidencia de plagas y enfermedades, aunado al alto requerimiento de agua por parte del cultivo.

Damour *et al.* (2012) demostraron que la baja disponibilidad de agua, en el caso de *Musa* AAA, se tradujo en un retardo y disminución en la floración para garantizar el mantenimiento del crecimiento vegetativo. Adicionalmente, Akinro *et al.* (2012) establecieron la alta susceptibilidad

de las musáceas ante el déficit hídrico durante todas las fases del crecimiento, confirmando la alta necesidad de suplencia constante de agua por parte de las musáceas comestibles.

Se hace necesario contar con genotipos tolerantes a sequía, a manera de ofrecer materiales que contribuyan al desarrollo socioproductivo de las comunidades, especialmente aquellas de bajos recursos y dedicadas a la actividad agrícola, donde *Musa* juega un papel preponderante. El cultivo de musáceas ha sido considerado prioritario para la seguridad y soberanía alimentaria, siendo utilizados en programas agrícolas destinados a pequeños y medianos productores, incluyendo los productores de subsistencia.

El cultivo de musáceas tiene un amplio potencial para expandirse hacia zonas cuya principal limitante es el estrés hídrico. Sin embargo, no existen genotipos de *Musa* AAA tolerantes al estrés hídrico, que puedan ser usados comercialmente en pequeñas unidades de producción. En tal sentido, no es posible obtener estos materiales mediante técnicas convencionales de mejoramiento, debido a que los materiales de interés son generalmente triploides y estériles (Alfaro, 2013; Tomepke *et al.*, 2004).

El uso de mutaciones inducidas ha sido exitoso en la obtención de mutantes en los distintos tipos de *Musa* (Pestana *et al.*, 2011; Jain, 2010; Roux *et al.*, 2003) además, existen protocolos eficientes de regeneración *in vitro* de musáceas comestibles (Izquierdo *et al.*, 2012; Giap *et al.*, 2012); lo que hace factible el uso de radiaciones ionizantes en tejidos meristemáticos los cuales podrían ser regenerados *in vitro*, para una selección más efectiva de plantas con tolerancia a sequía.

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar el efecto de radiaciones ionizantes en *Musa* AAA como mecanismo de inducción de mutaciones *in vitro*, con énfasis en la tolerancia a estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación utilizó, para los experimentos de la fase de dosimetría, 50 plantas de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante, presentes en la

colección de germoplasma del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, (INIA-CENIAP) en Maracay. El resto de los experimentos se realizaron partiendo de 200 brotes de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante donadas por los productores de cambur de Santa Cruz de Aragua, municipio Lamas del estado Aragua.

La muestra experimental se tomó de los materiales regenerados *in vitro* en la unidad de Biotecnología del INIA-CENIAP. Para el caso de los experimentos de dosimetría y establecimiento de las pruebas de dosis letales (DL) 50 de los osmóticos, cada tratamiento contó con 30 ápices caulinares cada uno y para la producción de mutantes se trabajó con 1000 ápices caulinares sometidos a irradiación.

Seguidamente, se realizó la calibración del proceso de irradiación, estableciendo los parámetros físicos para garantizar la uniformidad de la incidencia y de la intensidad de la radiación. Para tal fin, se utilizó un tomógrafo axial Phillips, modelo CT MX-16. Se midió el grosor de los recipientes con las plantas, la distancia de focalización de la radiación, y se calibraron los parámetros físicos a fin de garantizar una radiación uniforme.

Para establecer la dosis óptima de radiación a aplicarse a los explantes, se llevó a cabo la dosimetría; con dosis de 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 Gy. Se usaron 25 brotes foliados regenerados *in vitro* por tratamiento, al tiempo de medir la supervivencia de los explantes. Se siguió un diseño completamente aleatorizado y la unidad experimental constó de 5 brotes. Como dosis óptima se tomó aquella capaz de permitir la supervivencia del 50% de los explantes (DL50).

Posteriormente, fueron irradiados 980 brotes foliados de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) con la DL50, cuyos brotes se colocaron a crecer en frascos de vidrio transparentes de 250 ml de capacidad, provistos de 10 ml de medio cultivo líquido de sales Murashige y Skoog (MS, 1962), 30 g l⁻¹ de sacarosa y 5 mg l⁻¹ de bencil adenina (BA) durante 15 días para la recuperación de los brotes irradiados (M1V0). Estos se sembraron nuevamente en el mismo medio de multiplicación para incrementar su número (M1V1) y luego en el medio de selección.

Las plantas sobrevivientes (M1V2), fueron pasadas nuevamente al medio de multiplicación para incrementar el número de brotes (M1V3). De esta forma, se procedió a cultivar alternadamente en medio de selección y la subsecuente generación en el medio de multiplicación hasta llegar a la M1V6. En cada generación se tomaron datos sobre: supervivencia de los brotes, número de brotes, longitud de brotes, coloración de los tejidos (para identificar posibles mutaciones clorofilianas). En resumen, el proceso de selección se realizó en las progenies M1V2, M1V4 y M1V6.

Para la obtención del medio de selección, se procedió inicialmente a realizar el cultivo *in vitro* de ápices caulinares en medio MS suplementado con BA 5 mg l⁻¹. Se sembraron ápices caulinares de 1 mm de longitud en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo 10 ml del medio con las sales MS, suplementado con ácido nicotínico, tiamina HCl y piridoxina (1 mg l⁻¹ c/u), inositol (100 mg l⁻¹), BA 5 mg l⁻¹ y sacarosa 30 g l⁻¹. El pH se calibró a 5,8±0,02 previo a la esterilización en autoclave. El medio de cultivo se utilizó líquido. Los tubos con el medio se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión durante 20 min.

Los ápices caulinares, se extrajeron a partir de secciones de cormo de 1 cm³ aproximadamente. Las secciones de cormo se desinfectaron con una solución de Benlate (14,2 g l⁻¹) durante 20 min, se enjuagaron en alcohol 70% durante 2 min y posteriormente se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio 2,5% i.a. durante 10 min. El exceso de desinfectante fue eliminado con tres lavados sucesivos en agua destilada esterilizada y bajo condiciones de flujo laminar de aire estéril, se extrajeron los ápices caulinares de 1 mm de longitud y se sembraron en los tubos de ensayo con el medio líquido. Posteriormente, los brotes regenerados se cultivaron en frascos de 250 ml de capacidad con 10 ml del medio de cultivo. Los explantes se colocaron a crecer bajo luz fluorescente (16,95 W m⁻²) a 25±2 °C y un fotoperíodo de 16 h.

Seguidamente, se procedió al establecimiento de las pruebas DL50, 75 y 100 en medios con Polietilén glicol (PEG 8000), como mecanismos de selección al estrés hídrico. Para determinar las dosis, se sembraron ápices caulinares en el medio MS con 5 mg l⁻¹ BA conteniendo

0, 10, 20, 30 y 40% de PEG 8000 estudiando así la supervivencia de los explantes. En cada tratamiento se observó el oscurecimiento de los tejidos, la ubicación del oscurecimiento en el órgano afectado y la coloración del medio de cultivo. Se sembraron 10 explantes por tratamiento bajo un diseño completamente aleatorio. Las observaciones se tomaron diariamente por un lapso de 15 días. Los explantes se colocaron a crecer bajo luz fluorescente ($16,95 \text{ W m}^{-2}$) a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, y un fotoperíodo de 16 h.

La progenie M1V6 fue cultivada en un umbráculo, bajo condiciones de estrés hídrico como inicio de la caracterización final de la tolerancia a sequía. Fue realizada una evaluación morfológica de los 26 individuos seleccionados en términos de número, longitud de órganos aéreos, altura (cm), área foliar (cm^2), coloración del tallo y de las hojas, forma de las hojas y diámetro del tallo (cm).

Adicionalmente, se hicieron evaluaciones anatómicas de las hojas de plantas regeneradas a partir de brotes irradiados, comparándolas con las hojas de plantas de brotes no irradiados; en todos los casos se utilizaron plantas regeneradas *in vitro*. Para las observaciones anatómicas se fijaron los tejidos foliares en solución formaldehído, ácido acético y alcohol etílico (FAA) en la proporción 5:5:90, manteniéndolos a temperatura ambiente hasta el momento del análisis.

La preparación de la muestra se realizó según la metodología de Roth (1964), que consistió en un primer paso de la deshidratación gradual, en alcohol etílico a diferentes concentraciones: 30, 50, 70, 90, 100% y una mezcla de alcohol-Xilol (1:1). Las muestras se sumergieron durante 30 min en cada alcohol. Luego, el material vegetal se infiltró con parafina fundida a $63 \text{ }^\circ\text{C}$, haciendo 2 cambios de parafina cada 30 min, y un último cambio donde el tejido permaneció toda la noche.

Los cortes histológicos se realizaron en dos micrótomos, uno de deslizamiento marca Leica y otro de rotación marca Reichert Jung a $6 \mu\text{m}$. La tinción se realizó con una batería de coloración a base de safranina y fastgreen. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico marca Leitz y las fotografías se tomaron con una cámara digital marca Celestron. Las muestras fueron observadas con un objetivo de 40x de aumento y un ocular de 10x. Se realizaron cortes en 3 plantas de cada tipo de material. El análisis se realizó mediante descripción comparativa entre los cortes de las plantas irradiadas y las no irradiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis tomográfico de los envases de cultivo (Figura 1) permitió establecer una metodología para la irradiación efectiva de los explantes. Se determinó que desde la base de los envases, y dada la ubicación general del material vegetal dentro de los mismos, el meristema caulinar se ubica a una distancia aproximada de 2 cm por

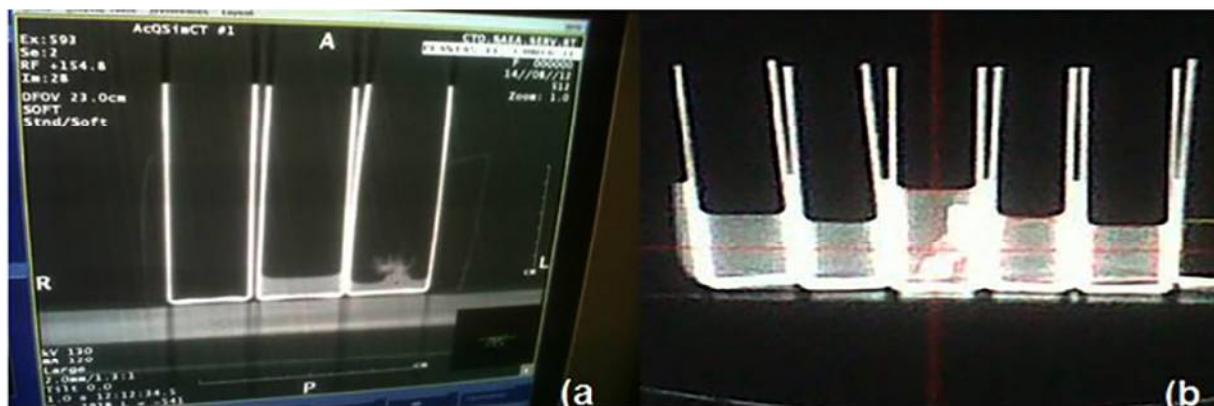


Figura 1. Diagramas tomográficos transversales de los recipientes a ser irradiados. a) De izquierda a derecha: el tubo vacío, tubo con medio de cultivo y el tubo con el material vegetal. b) Envases con 5 cm de líquido y una guía de focalización de la radiación colocada en el tubo central.

encima del borde inferior del recipiente. De igual manera, en virtud de la diferencia de tamaños de los brotes foliados, la irradiación se aplicó uniformemente en los primeros 5 cm, aplicados desde la parte inferior de los recipientes.

Los resultados de la dosimetría se presentan en el Cuadro 1. La selección se realizó de acuerdo a la DL50; el análisis de los datos mediante la prueba Shapiro y Wilk (1965) arrojó un valor $W= 0,91$; lo cual indica la distribución normal de los resultados. La prueba de Levene para homocedasticidad de la varianza produjo un valor de 0,87; lo cual prueba la homogeneidad de la misma. El Análisis de Varianza (Anavar) estableció diferencias significativas entre los tratamientos, por lo tanto las dosis empleadas fueron capaces de inducir efectos diferenciales en los tejidos.

Como puede observarse, los valores de supervivencia cercanos al 50% se orientan hacia la dosis de 30 Gy, lo cual coincide con Mishra *et al.* (2007) quienes utilizaron el mismo tipo de tejidos en *Musa* para la inducción de mutaciones. De igual modo, los resultados concuerdan con los obtenidos por Ali (2008) quien encontró que la dosis de 33,6 Gy fue la mejor para la inducción de mutaciones en *Musa* AAA. El autor reportó que el uso de irradiación con valores superiores a 40 Gy acarrea daños severos a los tejidos, ocasionando la muerte de

los explantes, lo que coincide con los resultados de la presente investigación.

Resultados similares también fueron reportados por Amorim *et al.* (2012) quienes lograron obtener mutantes de *Musa* AAB y AAAB utilizando radiaciones entre 20 y 30 Gy. Todos los resultados confirman la utilidad de las radiaciones ionizantes como herramientas ventajosas para el mejoramiento genético de musáceas. Debe tomarse en cuenta que la radiosensibilidad de los tejidos dependerá del tipo de tejido, del genotipo, del tipo de radiación, la intensidad de la misma y el tiempo de irradiación (Tulman, 1997).

Aun cuando se observó un porcentaje de supervivencia relativamente alto con la dosis de 45 Gy, los materiales que sobrevivieron presentaron una coloración verde clara y su tasa de crecimiento se vio seriamente reducida a pesar de mantenerse vivos los explantes. Esto pudiese indicar un posible efecto de latencia en el meristema de estos brotes, quizás producto del efecto directo de la irradiación. La tasa de multiplicación de las plantas se vio reducida a medida que se incrementaba la dosis de radiación, coincidiendo con los resultados encontrados por Pabón (2011) al inducir mutaciones en esquejes de *Passiflora edulis*.

La respuesta puede estar relacionada a daños parciales en el tejido meristemático,

Cuadro 1. Porcentaje de supervivencia en yemas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante cultivadas *in vitro*).

Dosis (Gy)	Supervivencia (%)
0	100±0.00 ^a
15	92±10.95 ^a
30	52±10.95 ^b
45	32±17.89 ^{bc}
60	20±14.14 ^c
75	8±10.95 ^d
90	0±0.00 ^e
120	0±0.00 ^e

Letras iguales indica la no existencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Medias de Tukey a un nivel $\alpha=0,05$.

y la adaptación y posterior regeneración de estructuras dependerá de la radiosensibilidad de los tejidos, asociados a la capacidad interna de los mismos para recuperarse.

Lagoda (2012) estableció la hipótesis sobre el efecto iónico y químico que el tratamiento por irradiación podía tener sobre los tejidos. En este sentido, el efecto inicial iónico desencadenaría la formación de iones potencialmente tóxicos (p. ej. especies reactivas del oxígeno [ROS]) debido a las coaliciones entre las partículas atómicas del agente de irradiación y los átomos de los tejidos, complementándose con el efecto químico sobre las moléculas. Estos efectos están directamente relacionados con el tipo de radiación y su fuerza iónica o capacidad de impactar sobre los átomos de las células.

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos al analizar la radiosensibilidad de las yemas de *Musa* ante la incidencia de la radiación ionizante. Como se observa, hay una relación negativa entre el porcentaje de supervivencia y la dosis de irradiación. La tendencia es prácticamente lineal, ya que se tiene un coeficiente de determinación $R^2 = 0,87$; aun cuando las dosis por encima de 45 Gy presentan un efecto drástico negativo sobre la supervivencia de los brotes de *Musa in vitro*.

Kulkarniy *et al.* (2007) establecieron que la DL50 óptima para la inducción de mutaciones en yemas de *Musa* dependió del genotipo y se estimó alrededor de 30 Gy para *Musa* AAB y de 52 Gy para *Musa* AAA, recomendando el uso de un promedio de 40 Gy. En cualquiera de los genotipos, dosis por encima de 70 Gy resultaron completamente letales para los tejidos irradiados, coincidiendo con lo obtenido en el presente estudio. En el caso de suspensiones celulares, las dosis por encima de 40 Gy resultaron completamente letales, recomendándose el uso de 30 Gy como la dosis más efectiva para la inducción de mutaciones (Kulkarniy *et al.*, 2004).

A efectos de la fase masiva de irradiación, el valor seleccionado fue 30 Gy, donde los materiales que lograron sobrevivir presentaron tejidos de color verde intenso y lograron multiplicarse en condiciones *in vitro*.

El medio de selección se obtuvo mediante el cultivo *in vitro* de los brotes de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante en medios de cultivo con PEG 8000. La DL50 se obtuvo con la dosis de 2 g l^{-1} de PEG, equivalente a una concentración del 20%. Un efecto inhibitorio fue observado para la dosis de 40% de PEG sobre la morfología de las hojas, donde se notó un rápido necrosamiento de los bordes, especialmente en la zona apical (Figura 3). Con la concentración del 30% aún cuando el efecto fue menos pronunciado que

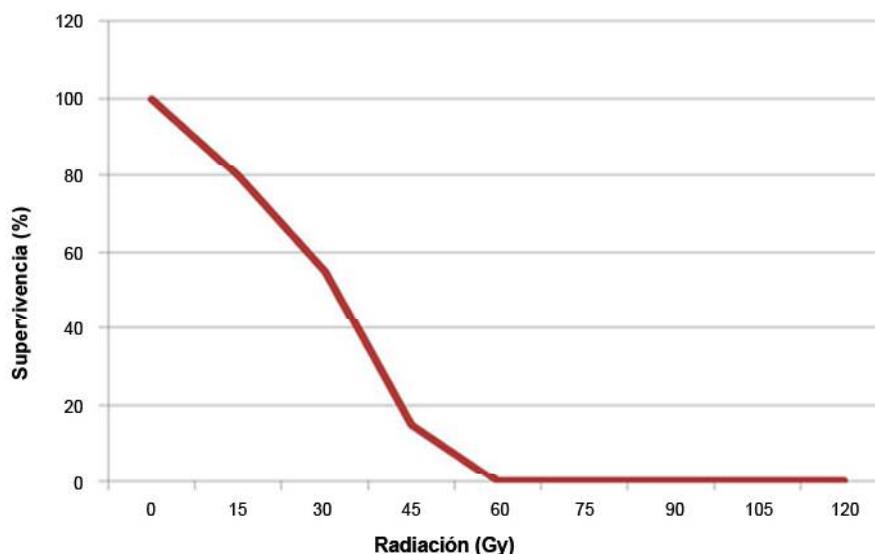


Figura 2. Porcentaje de supervivencia de yemas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) sometidas a diferentes dosis de radiación X (Gy).

con la concentración mayor, también se observó un necrosamiento de los márgenes foliares y de la zona apical pero comenzó a observarse el efecto de forma evidente a las 48 h de cultivo.

En el Cuadro 2, se presentan los resultados obtenidos para la supervivencia de los brotes foliados de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) creciendo en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de PEG para simular condiciones de estrés hídrico *in vitro*. Los datos se distribuyeron normalmente, comprobado con un índice $W=0,93$ en la prueba de Shapiro y Wilk (1965).

El análisis de varianza estableció diferencias significativas entre los tratamientos, por lo

cual la concentración de PEG causa efectos diferenciales en la supervivencia de los brotes foliados de *Musa* AAA. De igual modo, en el análisis de varianza no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las repeticiones, razón por la cual se consideraron confiables los resultados obtenidos para cada tratamiento.

Al analizar los cambios observados en la coloración del medio de cultivo, como respuesta al efecto del PEG 8000 sobre el desarrollo *in vitro* de yemas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) se evidenció que a medida que aumentó la concentración de PEG en el medio de cultivo, el proceso de oscurecimiento del



Figura 3. Explantes de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante creciendo en medios de cultivo con diferentes concentraciones de PEG 8000.

Cuadro 2. Efecto del Polietilén Glicol (PEG 8000) en la supervivencia de brotes foliados de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) cultivados *in vitro*.

PEG (%)	% Supervivencia
0	100.00 ± 0.00 ^a
10	92.00 ± 10.95 ^a
20	52.00 ± 17.89 ^b
30	28.00 ± 22.80 ^b
40	00.00 ± 0.00 ^c

Letras iguales significan que no hay diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba de rango múltiples de Tukey ($\alpha=0,05$).

medio se incrementó. Esto implicó un mayor exudado de compuestos de naturaleza fenólica desde los tejidos, como mecanismo de defensa o de adaptación al estrés osmótico.

El medio de cultivo que contenía PEG a concentraciones iguales o superiores a 30% tomó coloraciones irreversibles desde las primeras 24 h de cultivo. En este sentido, los explantes estarían creciendo en medios con concentraciones cada vez mayores de compuestos fenólicos, los cuales, pasado un umbral crítico, se convierten en citotóxicos para el tejido.

En el Cuadro 3, se detallan los resultados de la irradiación masiva de las yemas en el presente estudio y la dinámica de multiplicación de las yemas a través de los diferentes pasos de la presente investigación. Inicialmente, se irradiaron 980 brotes foliados de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante. Los materiales fueron irradiados sumergidos en 5 ml de medio de cultivo diluido e inmediatamente posterior a la irradiación, se traspasaron a tubos de 40 x 120 mm, contenido de 10 ml del medio de multiplicación fresco. 900 explantes de los inicialmente irradiados lograron establecerse *in*

vitro y permanecer completamente verdes, sin zonas de oscurecimiento de los tejidos.

Estos materiales lograron reproducir nuevos brotes a una tasa promedio de 3,5 brotes por explante. Se notó inicialmente que algunos de los brotes irradiados, aún cuando permanecían vivos, no lograban regenerar nuevos brotes adventicios, razón por la cual se estimó que en este tipo de materiales, las zonas meristemáticas sufrieron alteraciones, que le impidieron el desarrollo de nuevos brotes, considerándose estos brotes vivos, pero en condición latente.

En la segunda fase de multiplicación, que correspondió a la progenie M1V1, se observó un efecto similar de latencia, pero en esta progenie los explantes inicialmente regenerados, tuvieron una reducción significativa de la tasa de multiplicación, donde apenas el 25% de los explantes logró producir al menos dos nuevos brotes en este ciclo. Esta condición redujo sustancialmente el número de brotes disponibles para la primera fase de selección, la cual se realizó sólo con 1000 brotes foliados.

La disminución de esta capacidad regenerativa es frecuente en los tejidos sometidos a irradiación (Pabón, 2011). Por otro lado, se debe

Cuadro. 3 Producción de explantes y porcentajes de supervivencias para las distintas progenies obtenidas en el presente estudio.

	Material Inicial	Material Sobreviviente	% Supervivencia	Explantes Formados
M1V0	980	900	91.84	2940
M1V1	2940	2900	98.64	1000
M1V2	1000	460	46.00	460
M1V3	460	460	100.00	920
M1V4	920	400	43.48	400
M1V5	400	380	95.00	380
M1V6	380	140	36.84	140
Enraizamiento	140	90	64.29	90
Umbráculo	90	50	55.56	50
Prueba Sequia	50	30	60.00	30
Fisiología	26	26	100.00	35

tomar en cuenta que al usar tejido meristemático, se incrementa la posibilidad de creación de quimeras (Robinson y Galán, 2011) por lo que es necesario tomar medidas para la eliminación o disociación de esas quimeras (Roux *et al.*, 2004). Al final del proceso de selección se trasplantaron al umbráculo 90 plantas, de las cuales sólo 50 lograron adaptarse a las condiciones de suelo. Se piensa que la adaptación de los materiales se vió afectada por la calidad del sistema radical regenerado *in vitro*, el cual puede ser el factor fundamental para que la planta pueda sobrevivir en las nuevas condiciones ambientales y de suelo.

Una vez establecidas las plantas en las condiciones de umbráculo, se suspendió el riego y se evaluó el comportamiento de las plantas provenientes de yemas irradiadas durante 15 días. En este lapso, el 40% de las plantas seleccionadas *in vitro* no lograron soportar las condiciones de sequía simuladas en el umbráculo, quedando al final de esta fase un total de 30 plantas, que mantuvieron su morfología y su coloración verde a pesar de la falta de suplencia de agua. Los explantes lograron desarrollar brotes nuevos en un período de 21 días. Con el paso del tiempo, el proceso de rebrotación pudo reducirse a 15 días. Se obtuvo un promedio de 3 yemas por explante, oscilando el valor entre 1 y 6 brotes como máximo.

Resultados similares fueron reportados para el cultivo *in vitro* de *Musa* AAA por Sierra y Shribru (2010) quienes obtuvieron una tasa de multiplicación promedio de 3 a 4 brotes por explante de *Musa* cultivado *in vitro*, al suplementar el medio de cultivo con BA a 3-4 mg l⁻¹. Los mejores resultados se obtuvieron con el uso de la hormona sola o en combinación con ácido indol acético (AIA) a razón de 0,2 mg l⁻¹.

Desde el punto de vista morfológico, las plantas de cambur regeneradas tanto a partir de yemas irradiadas como de yemas no irradiadas, se caracterizaron morfológicamente en condiciones de umbráculo, bajo riego. Las plantas fueron evaluadas tres meses posteriores a su siembra. Los resultados para el parámetro altura de la planta se presentan en el Cuadro 4.

Se comprobó la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro y Wilk (1965) arrojando un parámetro W=0,95; indicativo de la distribución normal de los datos. La prueba de Levene para homocedasticidad de las varianzas, basado en las medias muestrales, produjo un valor P= 0,35; lo cual indica la homogeneidad de las varianzas. Ambos tratamientos presentaron coeficientes de variación relativamente bajos, sugiriendo una homogeneidad alta entre los valores obtenidos para cada tipo de explante.

El análisis de varianza permitió establecer diferencias significativas entre las alturas de los dos tipos de plantas, esto indica que el material proveniente de yemas irradiadas presenta valores promedios de altura más altos que las plantas provenientes de yemas no irradiadas. Efectos similares sobre una mayor altura de plantas irradiadas fueron reportados por Álvarez *et al.* (2012) en el caso de tomate, los cuales se han relacionado con una estimulación en la producción de proteínas, especialmente al utilizar dosis bajas de irradiación (Ramírez *et al.*, 2006).

Debido a que las dos muestras eran de tamaño relativamente pequeño se decidió hacer la prueba T de Student (Student, 1908), utilizando la fórmula para muestras de igual tamaño y varianza similar. El valor de la prueba T calculada fue 4,39; se comparó con el valor tabulado para un $\alpha=0,05$ y 48 g l (t= 2,02) estableciéndose que las dos medias son

Cuadro 4. Altura (cm) de plantas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) regeneradas *in vitro* a partir de yemas axilares irradiadas y no irradiadas.

Tipo de planta	Altura (cm)	Coefficiente de variación (%)
Proveniente de yemas irradiadas	23,99±3,45 ^{a*}	14,39
Proveniente de yemas no irradiadas	20,27±2,42 ^{b*}	12,92

diferentes y que efectivamente el valor de altura de las plantas provenientes de yemas irradiadas es estadísticamente superior al de las plantas no irradiadas. El efecto estimulante de dosis bajas de irradiación puede estar relacionado con la activación de sistemas isoenzimáticos que inducen la formación de sustancias fisiológicamente activas, incentivando tanto la división celular como procesos morfogénicos (Chen *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2013).

Para el caso de *Musa*, los trabajos realizados con mutantes han señalado un mayor crecimiento de las plantas testigo al compararlas con el crecimiento de las provenientes de yemas irradiadas (Bermúdez *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2003); sin embargo, los trabajos mencionados se han realizado sobre materiales de *Musa* AAB y *Musa* AAAB, ambos creciendo en condiciones de campo. En este sentido, tanto el efecto del genotipo, como la medición una vez establecidas las plantas en campo pueden tener efecto sobre la tendencia encontrada en el crecimiento de las plantas.

El estudio del grosor del pseudotallo entre los dos tipos de plantas permitió obtener los resultados que se muestran en el Cuadro 5. Como puede apreciarse, este parámetro establece que existen diferencias significativas entre los dos tipos de plantas, y que las plantas mutantes presentaron un grosor mayor que las plantas no irradiadas. Del mismo modo, al analizar el coeficiente de variación, se observa que hay una mayor variabilidad entre los materiales provenientes de plantas irradiadas, lo que significa que la distribución de valores para el diámetro del pseudotallo es más heterogénea en este tipo de plantas.

El análisis de distribución normal entre los datos, produjo un coeficiente $W=0,98$ de

acuerdo a la prueba de Shapiro y Wilk (1965), lo que establece la distribución normal de los resultados. La prueba de Levene, arroja un valor de $P=0,19$ basado en el análisis de las medias, estableciendo que para un nivel $\alpha=0,05$ las varianzas de ambas poblaciones pueden considerarse homogéneas, comprobándose los supuestos necesarios para realizar el análisis de la varianza. El análisis de varianza reportó un valor F con una $P=3,7 \times 10^{-7}$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y puede considerarse que las plantas mutantes son de mayor grosor. Al realizar la prueba T de Student (1908) se obtiene un valor de prueba T calculado de 3,63; el cual es mayor que el valor tabulado para $\alpha=0,01$ y 48 g l ($t= 2,4066$), corroborando la diferencia entre las medias obtenidas para el parámetro medido y confirmando la superioridad estadística de la media obtenida para el diámetro de las plantas mutantes.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Mudibu *et al.* (2012) quienes reportaron la disminución de parámetros morfométricos en mutantes de soya (*Glycine max* L.) al utilizar dosis bajas de irradiación. Del mismo modo, para el caso de *Musa*, Amorim *et al.* (2012) reportaron una disminución en los valores morfométricos de las plantas mutantes, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los mutantes y las plantas normales, a favor de estas últimas. Sin embargo, los mutantes producidos presentaron una mayor productividad y resultaron ser más precoces.

Es posible que el efecto de la irradiación sobre algunos parámetros morfométricos esté relacionado con el genotipo. En este sentido, Bidabadi *et al.* (2012) encontraron que las plantas mutantes de *Musa* presentaron mayor vigor

Cuadro 5. Diámetro del pseudotallo (cm) de plantas de cambur (*Musa* AAA cv. Píneo Gigante) regeneradas *in vitro* a partir de yemas axilares irradiadas y no irradiadas.

Tipo de planta	Diámetro (cm)	Coefficiente de variación (%)
Proveniente de yemas irradiadas	1,93±0,19 ^{a*}	9,79
Proveniente de yemas no irradiadas	1,65±0,15 ^b	9,00

*Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras según la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0,01$).

que las plantas normales y este mayor vigor ha caracterizado a los materiales tolerantes a sequía (Gopal *et al.*, 2008).

La morfología foliar fue otro parámetro examinado entre los dos grupos de plantas analizadas. Se encontró una variedad de formas de hojas entre las plantas provenientes de yemas irradiadas que presentaron además de la morfología típica de una hoja de musáceas (Figura 4a), hojas lanceoladas (Figura 4b) y hojas más elípticas (Figura 4c). De igual modo, se obtuvieron hojas con bordes lisos y hojas con bordes ondulados (Figura 4d). Las alteraciones en la morfología foliar han sido reportadas como uno de los cambios más frecuentes en el fenotipo de mutantes. Nomura *et al.* (2005) reportaron cambios en la morfología de las hojas en mutantes de tomate. En este sentido, Robles (1999) demostró que las alteraciones en la morfología foliar encontrada en *Arabidopsis thaliana* respondía a expresiones de genes directamente responsables de mecanismos de formación de las hojas.

Las diferentes modificaciones encontradas en los materiales seleccionados estuvieron posiblemente relacionadas con desrepresiones y expresiones ectópicas de genes, asociadas a la expresión constitutiva de mecanismos de defensa y a controles polares, tanto de la división como del crecimiento celular. Se han identificado 91 genes relacionados directamente con la formación de las hojas. En consecuencia es importante señalar que Kavaz *et al.* (2006) demostraron que la respuesta de tolerancia a sequía estaba estrechamente relacionada con la morfología y fisiología foliar, más que con la radical.

El análisis del área foliar se presenta en el Cuadro 6. El análisis de normalidad reveló que los datos se ajustaron a una distribución normal ($W=0,98$) (Shapiro y Wilk, 1965). De igual modo la prueba de Levene arrojó un valor $P=0,19$ basado en las medias aritméticas, lo cual demostró la igualdad de las varianzas. La distribución de los residuos siguió una tendencia positiva representada por una línea recta, con igual repartimiento de los



Figura 4. Morfología foliar de plantas de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante regeneradas *in vitro* a partir de yemas irradiadas. a) plantas con morfología foliar normal. b) hojas lanceoladas, c) hojas elípticas y d) hojas con bordes lisos y bordes ondulados.

Cuadro 6. Área foliar (cm²) de plantas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) regeneradas *in vitro* a partir de yemas axilares irradiadas y no irradiadas.

Tipo de planta	Área foliar (cm ²)	Coefficiente de variación (%)
Proveniente de yemas irradiadas	231,87±53,1 ^{a*}	22,91
Proveniente de yemas no irradiadas	161,03±37,0 ^b	23,03

*Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras según la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0,01$).

mismos, corroborando esto la independencia de los errores. El análisis de varianza estableció diferencias entre los dos grupos de plantas evaluadas, con un valor P asociado al estimador F de $1,61 \times 10^{-6}$; indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de plantas estudiadas.

Desde el punto de vista del área foliar, las hojas de las plantas mutantes presentan, en promedio, mayor superficie que las hojas de las plantas normales. El coeficiente de variación establece que hay una mayor heterogeneidad de áreas foliares entre las plantas normales que el rango encontrado entre las plantas provenientes de yemas irradiadas, a pesar de tener valores más altos y tener una mayor desviación estándar.

Mayor área foliar en los mutantes, comparados con el área foliar del genotipo normal, también fue señalado por Rodríguez *et al.* (1996) en el caso de frijol. Gianoli (2004) estableció que las plantas producían fenotipos diferentes en respuesta a cambios ambientales, lo que se conoce como plasticidad fenotípica.

Estas modificaciones morfofisiológicas, representan un proceso de adaptación donde generalmente hay la selección de genes responsables del nuevo comportamiento. Loveys *et al.* (2002) establecieron que las condiciones ambientales influían sobre los procesos metabólicos que contribuían a la biosíntesis, mantenimiento y crecimiento celular. De acuerdo a su plasticidad fenotípica se expresarán atributos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos diferentes (Atkin *et al.*, 2006), lo que explicaría las diversidades de formas y tamaños encontradas en cada grupo de plantas analizadas en el presente trabajo.

De igual modo, la menor área foliar en las plantas normales podría indicar un mecanismo

adaptativo ante la falta de agua, mientras que las plantas mutantes parecen mantener sus patrones de crecimiento foliar, sin percibir el estímulo del estrés hídrico como un factor de inducción de cambio morfológico en las hojas.

Por otro lado, Lin *et al.* (2012) reportaron la influencia de genes regulados por altas temperaturas sobre el proceso de morfogénesis foliar. Los procesos relacionados con las altas temperaturas, están altamente correlacionados con los efectos del déficit hídrico, y es posible que procesos transcripcionales diferentes entre las plantas susceptibles y las tolerantes se desencadenen para la formación del área foliar.

El análisis anatómico de las hojas permitió establecer diferencias significativas entre los dos tipos de plantas analizadas. Los cortes histológicos transversales del tejido foliar se presentan en la Figura 5. Puede observarse que ambos tipos de plantas presentan en sus mesófilos un parénquima en empalizada uniestratificado.

En los tejidos de plantas provenientes de yemas irradiadas, las células de este tejido parecen estar más compactas que en el caso de los tejidos presentes en el mesófilo de las plantas provenientes de yemas no irradiadas. El parénquima en empalizada de las plantas irradiadas se observó de una coloración verde más intensa, quizás por la presencia de un mayor número de cloroplastos en estos tejidos.

Sin embargo, la principal diferencia observada entre los dos tipos de hojas analizadas, se hace más evidente en la organización del parénquima esponjoso. El mesófilo de las hojas de las plantas irradiadas presenta un parénquima esponjoso más denso que el de las plantas no irradiadas. Existe una aparente mayor cantidad de cloroplastos en las plantas irradiadas y las

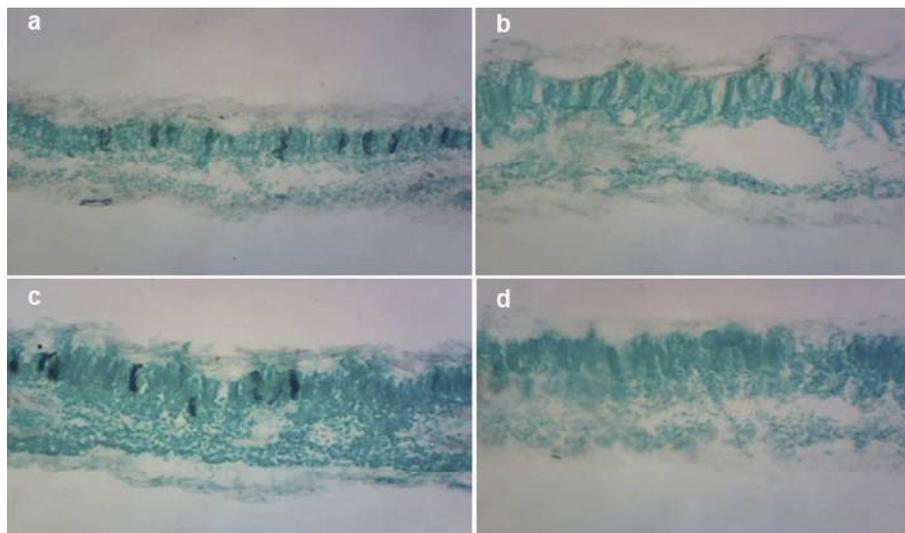


Figura 5. Cortes histológicos transversales de tejido foliar de plantas de *Musa* AAA cv. Píneo Gigante. a) y c) plantas provenientes de yemas irradiadas, b) y d) plantas provenientes de yemas no irradiadas.

células se presentan organizadas de modo más compacto, que en los tejidos de las hojas normales.

Estos resultados son opuestos a los encontrados por González (2007) en *Arabidopsis thaliana*, donde el mesófilo de las plantas mutantes era menos denso que el de las plantas normales. Sin embargo, ambos trabajos coinciden en que la epidermis de las hojas, tanto de las plantas mutantes como la de las normales, presentan el mismo tipo de estructura, tamaño de células y organización. El mantenimiento de las características estructurales de la epidermis ha sido característico en plantas de sombra, siendo más frecuentes los cambios en plantas heliófitas (Lima *et al.*, 2006).

De igual modo, no se encuentra diferencia en cuanto al espesor de las capas de parénquima, especialmente en el parénquima en empalizada. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cabral de Melo *et al.* (2011) para mutantes de tomate, quienes resaltan la relación del espesor de los tejidos con el contenido de fotorreceptores en los mismos, especialmente de los fitocromos. En este sentido, establecen además que el espesor de los tejidos puede ser menos reducido, si las plantas crecen en condiciones de baja intensidad de irradiación.

CONCLUSIONES

Se calibró una metodología para la inducción de mutaciones *in vitro* en *Musa* AAA utilizando radiaciones ionizantes, estableciéndose que para el caso de yemas cultivadas *in vitro*, la dosis de irradiación debía ser de 30 Gy, lo cual correspondió a la DL50. La selección de materiales tolerantes en condiciones *in vitro* debe realizarse en medios de cultivo suplementados con 20% de PEG (PM= 8000), lo cual corresponde a la DL50.

Se produjo *in vitro* la progenie M1V6, la cual permitió identificar 26 individuos con respuesta de tolerancia a condiciones simuladas de estrés hídrico, tanto *in vitro* como en condiciones de umbráculo. Los materiales regenerados a partir de yemas irradiadas presentaron mayor vigor, altura, diámetro de tallo y área foliar que los materiales regenerados a partir de yemas no irradiadas.

Desde el punto de vista anatómico, las plantas regeneradas a partir de yemas irradiadas presentaron una mayor densidad de cloroplastos, así como una mejor estructuración del parénquima esponjoso. No se encontraron diferencias anatómicas en el parénquima en empalizada, el cual presentó la misma distribución de células. Por lo tanto, las radiaciones ionizantes resultaron efectivas

en la inducción de cambios en *Musa* AAA cv. Pineo Gigante para el desarrollo de genotipos con tolerancia potencial a condiciones de estrés hídrico.

LITERATURA CITADA

- Akinro, A. O.; A. A. Olufayo and P. G. Oguntunde. 2012. Crop Water Productivity of Plantain (*Musa* sp.) in a Humid Tropical Environment. *Journal of Engineering Science and Technology Review*. 5(1):19-25.
- Alfaro, F. 2013. Aislamiento y cuantificación de bacterias epifitas del filoplano de banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) y selección de cepas quitinolíticas y glucanolíticas como potenciales antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra. Doctoral dissertation, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 120 p.
- Ali, M. A. 2008. Optimal dose rate of gamma irradiation and EMS concentration for mutation induction on shoot tip of Banana cv. Grand Nain. *Proceedings of the 38th meeting of the NCHC*. ARC Sudan. 228-233.
- Álvarez, A.; L. Chávez-Suárez; R. Ramírez; R. Pompa y W. Estrada. 2012. Indicadores fisiológicos en plántulas de *Solanum lycopersicum* L., procedentes de semillas irradiadas con rayos X. *Biotecnología Vegetal*. 12(3):173-177.
- Álvarez, A.; L. Chávez-Suárez; R. Ramírez; R. Pompa; W. Estrada; Y. Estrada y A. Maldonado. 2013. Efecto del tratamiento de semillas con bajas dosis de rayos X en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Nucleus*. 53:14-18.
- Amorim, E. P.; R. K. N. Pestana; S. De Oliveira e A. Tullman-Neto. 2012. Caracterização agrônômica de mutantes de bananeira obtidos por meio da radiação gama. *Bragantia*, Campinas. 71(1):8-14.
- Atkin, O. K.; B. R. Loveys; L. J. Atkinson and T. L. Pons. 2006. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability. *J. Exp. Bot.* 57:267-281.
- Bermúdez, I.; P. Orellana; J. Pérez Ponce; J. Clavero; N. Veitia; C. Romero; R. Mujica y L. García. 2000. Mejoramiento del clon híbrido FHIA 21 con el uso de la mutagénesis *in vitro*. *Info Musa*. 9(1):16-19.
- Bidabadi, S. S.; S. Meon; Z. Wahab; S. Subramaniam and M. Mahmood. 2012. *in vitro* selection and characterization of water stress tolerant lines among ethyl methanesulphonate (EMS) induced variants of banana (*Musa* spp., with AAA genome). *Aust. Jour. Crop. Sci.* 6(3):567-575.
- Cabral de Melo, H.; M. E. De Castro; E. Alves y F. J. Perina. 2011. Anatomia foliar de Microtomateiros Fitocromo-Mutantes e Ultra-Estrutura de Cloroplastos. *Ciênc. Agrotec., Lavras*. 35(1):11-18.
- Chaves, M. and B. Davies. 2010. Drought effects and water use efficiency: improving crop production in dry environments. *Functional Plant Biology* 37: 3-6.
- Chen, Y. P.; Y.J. Liu; X. L. Wang; Z. Y. Ren and M. Yue. 2005. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *Isatis indigotica*. *J. Integrat. Plant. Biol.* 47(7):849-855
- Conde-Álvarez, C. y S. Saldaña-Zorrilla. 2007. Cambio climático en América Latina y el Caribe: Impactos, vulnerabilidad y adaptación. *Revista Ambiente y Desarrollo de Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente (CIPMA)*. 23(2):23-30.
- Damour, G.; H. Ozier-Lafontaine and M. Dorei. 2012. Simulation of the growth of banana (*Musa* spp.) cultivated on cover-crop with simplified indicators of soil water and nitrogen availability and integrated plant traits. *Field Crops Research*. 130:99-108.
- Gianoli, E. 2004. Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. **En:** Fisiología ecológica en plantas: mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Editor Hernán Marino Cabrera. Euv. Valparaíso, Chile. pp. 13-25.
- Giap, D. D.; P. N. Vinh; T. T. Tuan; N. T. H. Trang; P. N. A. Thu and T. X. Du. 2012. High-frequency shoot multiplication of laba banana (*Musa* sp.) cultured *in vitro*

- by using light, myo-inositol and adenin sulphate. Vietnam Academy of Science and Technology. 34:(3)180-187.
- González, R. 2007. Caracterización genética y molecular de los genes RE e ICU2 de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral presentada ante la Universidad Miguel Hernández. Elche, España. 151 p.
- Gopal, J.; K. Iwama; Y. Jitsuyama. 2008. Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. *In vitro* Cell Dev Biol Plant. 44:221-228.
- Izquierdo, H.; D. M. Núñez; M. C. González and R. Proenza. 2012. Effects of applying of brassinosteroids analog spirostanoic in banana (*Musa* spp.) *in vitro* plants during acclimatization phase. *Cultivos Tropicales*. 33(1):71-76.
- Jain, S. M. 2010. *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa* spp.) Improvement. *Acta Hort.* (ISHS). 879:605-614.
- Kavas, M.; G. Kalemantas; U. C. Ackay; A. T. Bayrak; E. Ozgur; C. Baloglu; O. Ercan; M. Yucel and H. A. Oktem. 2006. Effect on drought stress on the antioxidant system of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars. Proceedings of the symposium on Stress and plant biology. Integrating hierarchical levels of biological organization. 24th annual meeting ESCPB. Antwerp. 20 p.
- Kulkarni, V.; T. Ganapathi; P. Suprasanna and V. Bapat. 2007. *In vitro* Mutagenesis in Banana (*Musa* spp.) using Gamma Irradiation. In: Protocols for micropropagation of woody trees and fruits, Part 3, Jain and Haggman Eds. Springer, Dodrecht, The Netherlands. pp. 543-559.
- Kulkarni, V. M.; T. R. Ganapathi; V. A. Bapat and P. S. Rao. 2004. Establishment of cell-suspension cultures in banana cv. Grand Naine and evaluation of its sensitivity to gamma-irradiation. *Curr. Sci.* 86:902-904.
- Lagoda, P. J. L. 2012. Effects of radiation on living cells and plants. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. Shu, Q. Y.; B. P. Orster and H. Nakagawa, Eds. Ediciones IAEA. Viena. pp. 123-134.
- Lima, E. C.; A. A. Alvarenga; E. M. Castro; C. V. Vieira e J. P. R. A. D. Barbosa. 2006. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore*, Viçosa. 30:33-41.
- Lin, L.; S.-H. Zhong; X. F. Cui; J. Li; Z.-H. He. 2012. Characterization of temperature-sensitive mutants reveals a role for receptor-like kinase SCRAMBLED/STRUBBELIG in coordinating cell proliferation and differentiation during *Arabidopsis* leaf development. *The Plant Journal*. 72(5):707-720.
- Loveys, B. R.; I. Scheurwater, T. L. Pons; A. H. Fitter and O. K. Atkin. 2002. Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast- and slow growing plant species. *Plant Cell Environ.* 25:975-987.
- Mishra, P. J.; P. Suprasanna and V. A. Bapat. 2007. Effect of Single and Recurrent Gamma Irradiation on *in vitro* Shoot Cultures of Banana. *International Journal of Fruit Science*. 7(1):47-57.
- Mudibu, J.; K. K. C. Nkongolo; A. Kalonji-Mbuyi and R. B. Kizungu. 2012. Effect of Gamma Irradiation on Morpho-Agronomic Characteristics of Soybeans (*Glycine max* L.). *American Journal of Plant Sciences*. 3:331-337.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 5:473-497.
- Narasimhan, B. and R. Srinivasan. 2005. Development and evaluation of Soil Moisture Deficit Index (SMDI) and Evapotranspiration Deficit Index (ETDI) for agricultural drought monitoring. *Agric. For. Meteorol.* 133:69-88.
- Nomura, T.; T. Kushiro; T. Yokota; Y. Kamiya; G. J. Bishop and S. Yamaguchi. 2005. The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 280:17873-17879.

- Pabón, L. A. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de *Passiflora edulis* var *edulis*. Trabajo de investigación para optar al grado de Maestría en ciencias en biología-línea genética, presentado ante la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 105 p.
- Pestana, R. K. N.; E. P. Amorim; C. F. Ferreira.; V. B. O. Amorim; L. S. Oliveira; C. A. S. Ledo and S. O. Silva. 2011. Genetic dissimilarity of putative gamma-ray-induced 'Preciosa-AAAB-Pome type' banana (*Musa* sp.) mutants based on multivariate statistical analysis. *Genetics and molecular research*. 10(4):3976-3986.
- Quiring, M. S. and T. N. Papakryiakou. 2003. An evaluation of agricultural drought indices for the Canadian prairies. *Agric. For. Meteorol.* 118:49-62.
- Ramírez, R.; L. M. González; Y. Camejo; Y. Fernández y N. Zaldívar. 2006 Estudio de radiosensibilidad y selección de rango de dosis estimulantes de rayos X, en cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*. 27(1):63-67.
- Robinson, J. C. y V. Galan. 2011. Plátanos y bananas. 2da Edición. Ediciones Mundiprensa C.A. Madrid. 321 p.
- Robles, P. 1999. Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández. Alicante, España. 160 p.
- Rodríguez, N.; L. Mora; M. Marín; D. Esparza y A. Del Villar. 1996. Análisis del desarrollo foliar del cultivo del frijol (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) variedad ojo negro y tres de sus mutantes en los alrededores de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 13:521-531.
- Roth, I. 1964. Microtecnia vegetal. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Imprenta Universitaria. Caracas. 88 p.
- Roux, N. S.; A. Toloza; J. Dolezel and B. Panis. 2004. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutants in *Musa* spp. Ed. Jain, S. M.; R. Swennen; Leuven, Belgium. 382 p.
- Roux, N.; A. Toloza; Z. Radecki; F. J. Zapata-Arias and J. Dolezel. 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Rep.* 21:483-490.
- Schaper, M.; E. Gitli; E. Villalobos; S. Rodríguez; N. Mateo; N. Martín y A. Garduño. 2000. Impactos ambientales de los cambios en la estructura exportadora en nueve países de América Latina y el Caribe. Publicaciones CEPAL P01: 123, Santiago de Chile (Chile). pp. 1980-1995.
- Shapiro, S. S. and M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 52(3-4):591-611.
- Sierra, Y. M. y S. Shribu. 2010. Efecto de la benciladenina y el ácido indolacético en la propagación *in vitro* de bananos (*Musa* spp. AAA). *Hombre, ciencia y tecnología*. 55:167.
- Student. 1908. The Anp probable error of a mean, *Biometrika*. 6(1):1-25.
- Tomekpe, K.; C. Jenny y J. V. Escalant. 2004. Mejoramiento genético, análisis de las estrategias de mejoramiento convencional de *Musa*. *Info Musa*. 13(2):1-6.
- Tulmann, N. A. 1997. Mutaciones en el mejoramiento de plantas de propagación sexual. Curso Internacional de Mutaciones Inducidas en el Mejoramiento de las Plantas, Monagas, Venezuela. 7 p.
- Wilhite, D. A. 2000. Drought as a natural hazard. In: *Drought: A Global Assessment*. Wilhite, D. A. (ed). Routledge Publishers, London, UK. pp. 3-18.
- Wu, H.; K. G. Hubbard and D. A. Wilhite. 2004. An agricultural drought risk assessment model for corn and soybeans. *Int. J. Climatol.* 24:723-741.

Contenido de fenoles en clones de musáceas ‘Pineo Gigante’ y ‘Cambur Manzano’

Phenol content in ‘Pineo Gigante’ and ‘Cambur Manzano’ musaceae clones

Orquídea G. Pérez Chacín¹; Iselen E. Trujillo Díaz^{1*} y Morela M. Fuchs Delgado²

¹Centro de Estudios para el Desarrollo Agroecológico Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). ²Unidad de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). *Correo electrónico: iselen03@yahoo.com.

RESUMEN

Los fenoles son compuestos fitoquímicos que pertenecen al metabolismo secundario de las plantas. En las musáceas, juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la planta ante el estrés ocasionado por deficiencia de nutrientes o ataques de microorganismos. Igualmente, se le han atribuido propiedades medicinales en diversas afecciones de la salud, donde se les ha señalado para tratar desordenes cardiovasculares, prevención y tratamiento de algunos tipos de cáncer, problemas gastrointestinales, e infecciones y contracturas musculares. El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de fenoles en hojas y pseudotallos de los cultivares ‘Pineo Gigante’ (*Musa* AAA) y ‘Cambur Manzano’ (*Musa* AAB) desarrollados en condiciones *in vivo*, y hojas *in vitro* tanto a nivel cualitativo como a nivel cuantitativo. Los resultados cualitativos manifestados por cambios de coloración, indican que el ‘Cambur Manzano’ tiene mayor cantidad de fenoles en comparación con el ‘Pineo Gigante’. En cuanto a los cultivares *in vitro* e *in vivo* a nivel cuantitativo, se encontró que el contenido de fenoles en ‘Cambur Manzano’ es mayor comparado con el ‘Pineo Gigante’. Igualmente, se pudo constatar que los cultivares *in vitro* tienen mayor cantidad de fenoles en comparación con los evaluados *in vivo*. Los resultados señalados anteriormente, podrían ser de gran utilidad para la obtención de extractos fenólicos, que pueden ser utilizados con diferentes fines.

Palabras clave: *Musa* AAA, *Musa* AAB, extractos fenólicos.

ABSTRACT

Phenols are phytochemicals compounds belonging to the secondary metabolism of plants. In *Musa*, is important role in the maintenance of the plant due to stress caused by nutrient deficiency or microorganisms attacks). Similarly, they were attributed medicinal properties in various health conditions, relating this fact to their phenol composition, which has appointed them to treat cardiovascular disorders, prevention and treatment of some cancers, gastrointestinal problems, and infections and muscle contractures. The objective of this research was to determine the phenol content in leaves of the cultivars ‘Pineo Gigante’ (*Musa* AAA) and ‘Cambur Manzano’ (*Musa* AAB), developed under *in vivo* conditions (leaf and pseudostem) and *in vitro* (leaves) both qualitatively and quantitatively. The qualitative results expressed by color changes indicate that the ‘Cambur Manzano’ has a higher amount of phenols in comparison to the ‘Pineo Gigante’. Regarding cultivars *in vitro* and *in vivo* quantitative level, it was found that the ‘Cambur Manzano’ is higher compared to the ‘Pineo Gigante’. Similarly, it was found that *in vitro* cultivars have a higher amount of phenols compared to those evaluated *in vivo*. The results obtained would be very useful for obtaining phenolic extracts, which can be used for different purposes.

Key words: *Musa* AAA, *Musa* AAB, phenolic extracts.

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles, son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante que incluye a los fenoles ácidos y flavonoides (Drago *et al.*, 2006). Se encuentran en ciertos órganos de las plantas o bien pueden ser formados en respuesta al ingreso del patógeno (Nicholson, 1990). Estos son productos del metabolismo secundario de la planta y su biosíntesis se realiza en situaciones de estrés, ocasionado por deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos (Florio, 1997; Domingo y López, 2003).

En las plantas, los fenoles pueden participar en la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales y procesos alelopáticos (Paladino, 2008); y especialmente en la defensa ante la presencia de patógenos. En el caso particular de las musáceas, el fenotipo de resistencia parcial parece estar ligado a la acumulación de compuestos fenólicos especializados que se almacenan en las células del parénquima (Torres *et al.*, 2009).

En los seres humanos, los fenoles actúan como antisépticos, desinfectantes y anestésicos locales (Bailey y Bailey, 1998). La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienviejamiento (Velioglu *et al.*, 1998; Proestos *et al.*, 2005). También, inhiben la acción de agentes mutágenos, estimulando la actividad de la enzima fenolsutransferasa, implicada en la detoxificación de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos, y poseen actividad bactericida. Además, previenen la agregación plaquetaria e inducen a la relajación muscular, permitiendo inhibir los síntomas alérgicos (Drago *et al.*, 2006).

De acuerdo a estudios preliminares, las musáceas son ampliamente utilizadas en problemas digestivos, debido a que tiene sustancias similares a la mucosa gástrica, las cuales normalizan el funcionamiento del estómago (Castañeda *et al.*, 1995; Albornoz, 1997; Martínez *et al.*, 1999; Devouard, 2001; Vásquez *et al.*, 2008). De igual manera, el jugo extraído del pseudotallo del 'Cambur Manzano' (*Musa* AAB), ha sido utilizado como agente citostático para retrasar el proceso de

proliferación de células cancerígenas (Albornoz, 1997).

Con referencia a lo anteriormente señalado, es importante destacar que diferentes partes del banano (frutos, hojas, pulpa), han sido empleados para el tratamiento de úlceras, identificándose a taninos y fenoles como componentes principales en dicha acción terapéutica (Pérez *et al.*, 2002).

Debido a la importancia de los fenoles en diversos procesos asociados al metabolismo vegetal y a su acción en diferentes afecciones de salud en el ser humano, el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de fenoles en plantas de 'Pineo Gigante' (*Musa* AAA) y 'Cambur Manzano' (*Musa* AAB), desarrolladas en condiciones *in vivo* e *in vitro*, datos que pueden ser útiles en procesos de mejoramiento genético en musáceas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron los cultivares de musáceas 'Pineo Gigante' y 'Cambur Manzano' *in vivo*, donados por el banco de germoplasma del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), estado Aragua.

De igual manera se usaron los mismos cultivares obtenidos a través de procesos de propagación *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Centro de Estudios para el Desarrollo Agroecológico Tropical (CEDAT), adscrito al Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT), perteneciente a la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR); y en la Unidad de Biotecnología Vegetal del INIA-CENIAP, estado Aragua.

Las plantas utilizadas para los análisis químicos *in vivo* presentaron una edad de 6 meses contados a partir de la siembra. Los análisis químicos de las vitroplantas, se realizaron cuando estaban en la fase de enraizamiento.

Determinación de fenoles

Se emplearon métodos cualitativos y cuantitativos para la determinación de fenoles existentes en hojas y pseudotallos de los cultivares, donde se utilizaron tres réplicas por análisis (Figuras 1 y 2).

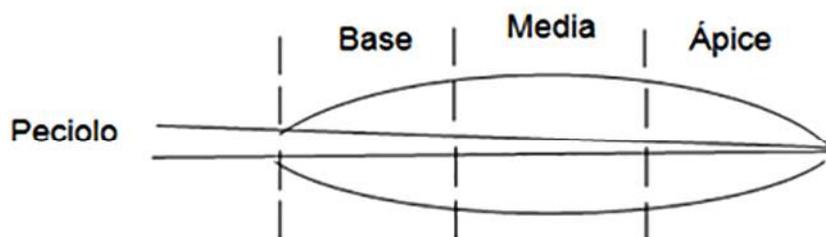


Figura 1. Representación gráfica de los segmentos de la hoja evaluados *in vivo* en los clones ‘Cambur Manzano’ (*Musa* AAB) y ‘Pineo Gigante’ (*Musa* AAA).

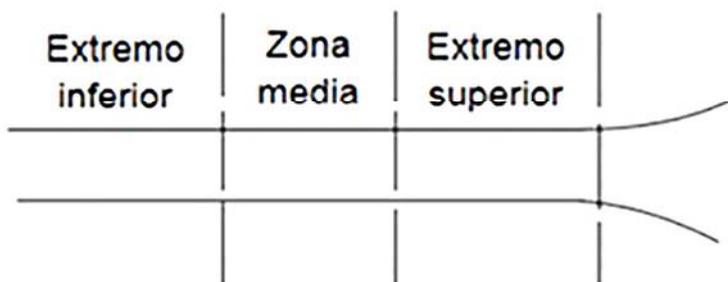


Figura 2. Representación gráfica de los segmentos del pseudotallo evaluados *in vivo* en los clones ‘Cambur Manzano’ (*Musa* AAB) y ‘Pineo Gigante’ (*Musa* AAA).

Para las pruebas cuantitativas, se seleccionaron muestras *in vitro* de la hoja completa del ‘Cambur Manzano’ y ‘Pineo Gigante’ con la finalidad de tener un parámetro de comparación en ambas condiciones.

Determinación de fenoles a nivel cualitativo

La determinación de fenoles se realizó en muestras de hojas y pseudotallo *in vivo* y en hojas *in vitro* de los cultivares ‘Pineo Gigante’ y ‘Cambur Manzano’, respectivamente.

Se utilizó el método de Galindo *et al.* (1989) modificado, para tener un aproximado de la cantidad de fenoles de los segmentos de clones seleccionados, de acuerdo a los cambios de coloración de las muestras; y para la determinación del tipo de fenoles, se empleó la clasificación según Hinojosa *et al.* (2012), que describe los cambios de coloración y el tipo de compuesto (Cuadro 1).

Para la preparación y extracción de los fenoles contenidos en la muestra de los cultivares seleccionados, se utilizó un mortero donde se maceraron los segmentos de la planta con nitrógeno líquido, se pesaron 5 g de muestra, se añadieron 15 ml de éter de petróleo, se agregaron 15 ml de metanol, y finalmente la muestra fue filtrada empleando papel de filtro N° 3, en un embudo de separación. El líquido se dejó reposar, obteniéndose dos capas, se procedió a extraer la capa inferior correspondiente a la fracción metanólica y se colocó la muestra en un eppendorf, preservándolas congeladas hasta realizar las pruebas colorimétricas. Para detectar fenoles en la muestra, se agregaron gotas obtenidas de la extracción metanólica en un platillo de prueba, en el cual se usaron tres compartimientos que contenían gotas de: cloruro férrico (FeCl_3) al 0,5 M; cloruro férrico (FeCl_3) al 1 %; y agua destilada, respectivamente.

Cuadro 1. Caracterización de fenoles basándose en la coloración de la muestra (Hinojosa *et al.*, 2012).

Cambio de coloración	Tipos de fenoles
Sin cambio de coloración	Ausencia de fenoles.
Azul oscuro	Presencia de fenoles o taninos pirogálicos.
Verde oscuro	Presencia de fenoles o taninos de tipo catecol (flavonoides o taninos concentrados).

Determinación de fenoles a nivel cuantitativo

La determinación de fenoles a nivel cuantitativo, se realizó en hojas y en pseudotallo *in vivo*, y solo en hojas *in vitro* de los cultivares 'Pineo Gigante' y 'Cambur Manzano' utilizando la metodología de Hernández *et al.* (2002), la cual consistió en macerar en un mortero las muestras frescas, y posteriormente secarlas en estufa a 60 °C por 72 horas. Al material seco, se le agregó metanol al 50%, en una proporción 1:5 peso/volumen. Se colocó en un agitador orbital por 1 hora a 200 rpm, se filtró la muestra y se colocó en tubos eppendorf. Posteriormente, se guardó en el congelador a -20 °C hasta realizar la determinación, utilizando para ello una curva patrón de ácido tánico; y expresándose las concentraciones en mg ml⁻¹ (AOAC, 1995).

También, se empleó el método Folin Ciocalteu, modificado por Waterman y Mole, según Hernández *et al.* (2002), en el cual se extrajo 100 µl de la fracción metanólica de la muestra y se colocó en un tubo falcon de capacidad 14 ml. Al mismo, se le agregaron 7,5 ml de agua destilada, se añadió 0,5 ml del reactivo Folin – Ciocalteu a 1 N, y a partir del minuto 1 hasta máximo 8 minutos se agregaron 1,5 ml de solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20%. Se aforó a 10 ml con agua destilada y se dejó reposar durante dos horas, midiéndose la densidad óptica de cada una de las muestras con el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 760 nm. Se realizaron dos réplicas por determinación.

Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los datos obtenidos en la determinación cuantitativa de fenoles, se emplearon métodos no paramétricos, ya que es una muestra atípica, por tener solo tres

repeticiones, donde el comportamiento de esta variable no tenía una distribución normal. Para este caso, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y U Mann Whitney, con el paquete estadístico SPSS (Pardo y Ruíz, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios químicos

Determinación de la concentración de fenoles a nivel cualitativo: se realizaron ensayos con muestras *in vivo* de la hoja y el pseudotallo de hijuelos de los cultivares 'Pineo Gigante' y 'Cambur Manzano', para los cuales se observó que el cloruro férrico (FeCl₃) al 1% es la concentración adecuada para ver los cambios de coloración.

En la Figura 3, se observan los cambios de coloración en cada zona de la hoja, de acuerdo a la concentración de fenoles *in vivo*. En este caso, las coloraciones correspondiente al ápice de las hojas del 'Pineo Gigante' y 'Cambur Manzano' fueron de verde oscuro, mientras que en la zona media de la hoja fue de verde más claro para ambos cultivares, y en la base y el peciolo fue de menor coloración, lo cual está directamente relacionado con la concentración de fenoles de cada una de los segmentos de las hojas.

Al comparar los cultivares Pineo Gigante y Cambur Manzano, solo se observaron diferencias en la zona apical y zona media, resultando en ambos casos coloraciones más oscuras para 'Cambur Manzano'.

En la Figura 4, se puede apreciar que todas las muestras presentaron coloración verde claro; sin embargo, es importante destacar que en el extremo superior del pseudotallo, la coloración es un poco más oscura para 'Cambur Manzano',

por lo cual, existe la posibilidad de que esa área tenga una mayor concentración de fenoles.

En el Cuadro 2, se muestra una representación gráfica de los resultados de la determinación cualitativa de los fenoles, en las diferentes muestras correspondientes a los segmentos seleccionados de ‘Pineo Gigante’ y ‘Cambur Manzano’ en plantas *in vivo*.

Para ‘Pineo Gigante’, se observa que la proporción correspondiente al ápice de la hoja, tiene mayor cantidad de fenoles, en comparación con las muestras representadas por la zona media, base y peciolo, lo cual puede

determinarse por la coloración verde claro y amarillo que tienen estas últimas.

En el cultivar ‘Cambur Manzano’, se aprecia que las muestras correspondientes al ápice y a la zona media, presentaron coloración verde oscuro en comparación con la proporción representada por la base, el peciolo y los segmentos del pseudotallo. Por lo tanto, se concluye que el ápice y la zona media, poseen mayor cantidad de fenoles. En relación a la concentración de fenoles del pseudotallo, se observa una coloración verde claro para todos los segmentos estudiados (Cuadro 2).

Área \ Reactivo	Hoja							
	Ápice		Media		Base		Peciolo	
	Cambur manzano	Pineo gigante						
FeCl ₃ 1% muestra								
Agua destilada								

Figura 3. Contenido de fenoles a nivel cualitativo de la hoja en plantas *in vivo* de ‘Cambur Manzano’ (*Musa AAB*) y ‘Pineo Gigante’ (*Musa AAA*) en agua destilada y en concentraciones de FeCl₃ al 1%.

Área \ Reactivo	Pseudotallo					
	Extremo superior		Zona media		Extremo inferior	
	Cambur manzano	Pineo gigante	Cambur manzano	Pineo gigante	Cambur manzano	Pineo gigante
FeCl ₃ 1% muestra						
Agua destilada						

Figura 4. Contenido de fenoles a nivel cualitativo del pseudotallo *in vivo* de ‘Cambur Manzano’ (*Musa AAB*) y ‘Pineo Gigante’ (*Musa AAA*) en agua destilada y en concentraciones de FeCl₃ al 1%.

Cuadro 2. Representación gráfica de las pruebas fitoquímicas en condición *in vivo* de los cultivares 'Pineo Gigante' (*Musa* AAA) y 'Cambur Manzano' (*Musa* AAB).

Variedades	Hoja				Pseudotallo		
	Ápice	Media	Base	Peciolo	Extremo inferior	Zona media	Extremo superior
'Pineo Gigante'	Verde oscuro	Verde claro	Amarillo	Amarillo	Verde claro	Verde claro	Verde claro
'Cambur Manzano'	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde claro	Amarillo	Verde claro	Verde claro	Verde claro

Las porciones representadas para la hoja de 'Pineo Gigante' presentaron tonalidades verde oscuro para la zona apical, verde claro para la media, y amarillo para la base y el peciolo; y para el pseudotallo, se observa una coloración verde claro para todos los segmentos estudiados (Cuadro 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que el 'Cambur Manzano' tiene mayor contenido de fenoles, ya que las muestras exhibieron coloraciones donde predomina el verde intenso y el verde claro. Por el contrario, en 'Pineo Gigante' se presentaron tonalidades que van desde el verde claro al amarillo, colores indicadores de menor concentración de fenoles.

En el caso de las muestras *in vitro*, se puede apreciar que el 'Cambur Manzano' presenta coloración verde más oscura, lo cual indica una mayor concentración de fenoles en comparación con el 'Pineo Gigante' (Figura 5).

Al respecto, Pasto y Jhonson *et al.* (1981) e Hinojosa *et al.* (2012), señalan que al realizar este tipo de análisis, las coloraciones oscuras indican una fuerte concentración de fenoles; las correspondientes al verde claro indican la presencia de fenoles o taninos de tipo catecol (flavonoides o taninos concentrados) y las amarillas, ausencia de fenoles.

Determinación de fenoles a nivel cuantitativo: en los estudios químicos de la investigación realizada, se compararon las cantidades de fenoles que hay en cada clon de acuerdo a su condición *in vivo* e *in vitro*, y también a las partes

de cada una de las plantas seleccionadas para dicho análisis.

La Figura 6 muestra la concentración de fenoles en los clones seleccionados. Se observa que la cantidad de fenoles fue significativamente mayor en los cultivares en condición *in vitro* ($57,93 \text{ mg ml}^{-1} \pm 16,27$) en comparación con los que se encontraban *in vivo* ($12,59 \text{ mg ml}^{-1} \pm 3,62$; U Mann – Whitney = 0,000; N = 52; P = 0,005).

En las muestras *in vitro* de ambos cultivares, se encontró que el contenido de fenoles es mayor para 'Cambur Manzano' ($63,38 \text{ mg ml}^{-1} \pm 7,51$) comparado con el clon 'Pineo Gigante' ($52,48 \text{ mg ml}^{-1} \pm 6,91$). Sin embargo, las diferencias observadas resultaron no ser significativas (U Mann-Whitney = 8,00; N = 10; P = 0,42).

Al respecto, es importante señalar, que el proceso de fenolización, y por ende la concentración de fenoles en los mismos, está íntimamente relacionado con el genotipo de la planta (Jiménez, 1997; Chavarría y López *et al.*, 2010).

En relación a las muestras *in vivo*, se encontró que el contenido de fenoles en 'Cambur Manzano' ($22,46 \text{ mg ml}^{-1} \pm 21,78$) es mayor comparado con el 'Pineo Gigante' ($20,15 \text{ mg ml}^{-1} \pm 3,42$); aun cuando las diferencias no son estadísticamente significativas (U Mann-Whitney = 215,50; N = 42; P = 0,90).

En la Figura 7, se observa que la concentración de fenoles en el ápice de la hoja del cultivar 'Pineo Gigante' ($17,70 \text{ mg ml}^{-1} \pm 2,72$) es mayor que en el resto de las zonas representadas en las hojas y el pseudotallo (U Mann Whitney = 1; N = 21; P = 0,009).

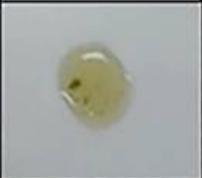
Reactivos Clones	Pineo gigante	Cambur Manzano
FeCl ₃ 1%		

Figura 5. Contenido de fenoles en hojas de vitroplantas de los cultivares ‘Pineo Gigante’ (*Musa AAA*) y ‘Cambur Manzano’ (*Musa AAB*).

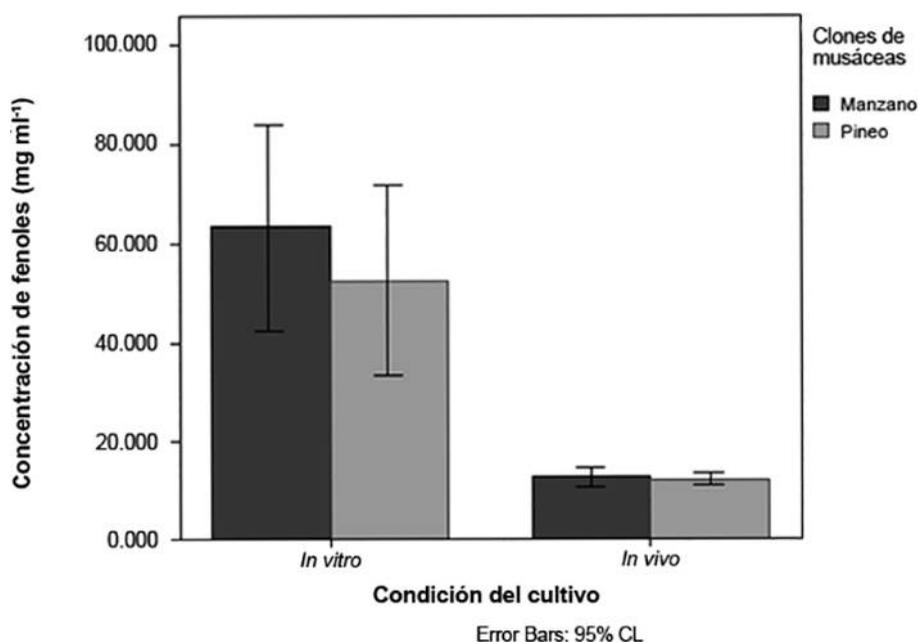


Figura 6. Concentración de fenoles en los clones ‘Pineo Gigante’ (*Musa AAA*) y ‘Cambur Manzano’ (*Musa AAB*) en condiciones *in vivo* e *in vitro*, utilizando la metodología Hernández *et al.* (2002).

Al agrupar los datos presentados en la Figura 8, se obtiene que el contenido de fenoles de los segmentos representados por la hoja de ‘Cambur Manzano’ presenta un contenido mayor de fenoles ($14,98 \text{ mg ml}^{-1} \pm 3,92$) en comparación con las estructuras del pseudotallo ($9,71 \text{ mg ml}^{-1} \pm 2,71$), siendo ésta una diferencia significativa (U Mann-Whitney = 12,0; N = 21; P = 0,02).

Relacionado con este aspecto, Veitia (1999) afirma que las plantas en campo, en su mayoría tienden a sintetizar compuestos fenólicos de tipo

flavonoides, principalmente en hojas y raíces para protegerse de los ataques de patógenos externos.

Por otro lado, en plantas que se cultivan en condiciones *in vitro*, el estrés tiende a ser mucho mayor en comparación con las de campo, ya que se somete al explante a una serie de pretratamientos que tienden a debilitar el tejido, lo cual provoca la síntesis de compuestos fenólicos que se manifiestan por el oscurecimiento de la vitroplanta (Álvaro, 2009).

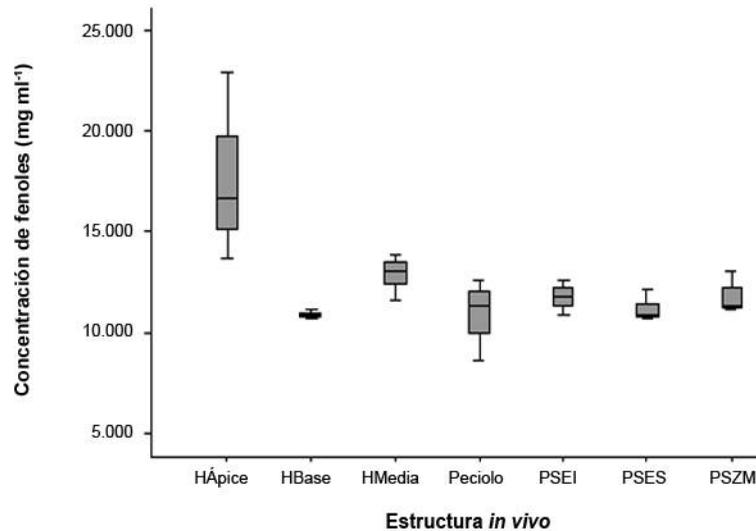


Figura 7. Concentración de fenoles de 'Pineo Gigante' (*Musa AAA*) en condiciones *in vivo* en diferentes partes de la planta, utilizando la metodología Hernández *et al.* (2002). HÁpice=Apice, HBase=Base, HMedia=Zona media, Peciolo=Peciolo, PSEI=Extremo inferior del pseudotallo, PSES=Extremo superior del pseudotallo, PSZM=Zona media del pseudotallo. Diferencias significativas (Kruskall - Wallis=12,23; N=21; G L=1, P=0,06 > 0,05).

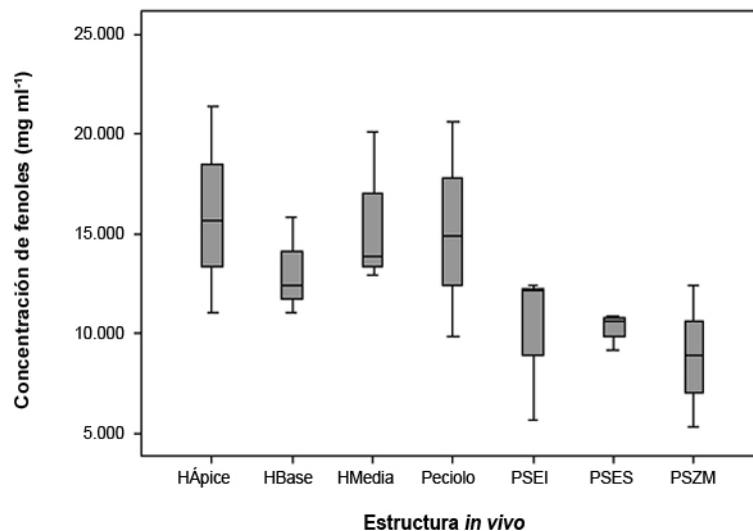


Figura 8. Comparación de la concentración de fenoles de 'Cambur Manzano' (*Musa AAB*) en condiciones *in vivo* de cada parte de la planta, utilizando la metodología Hernández *et al.* (2002). HÁpice=Apice, HBase=Base, HMedia=Zona media, Peciolo=Peciolo, PSEI=Extremo inferior del pseudotallo, PSES=Extremo superior del pseudotallo, PSZM=Zona media del pseudotallo. Las diferentes estructuras de las plantas *in vivo* si difieren en su contenido de fenoles. Diferencias significativas (Kruskall - Wallis=8,93; N=21; G L=1; P=0,03 < 0,05).

CONCLUSIONES

A nivel cuantitativo y cualitativo, las concentraciones de fenoles en condiciones *in vitro* son mayores en comparación con las muestras *in vivo*. Por otro lado, en plantas *in vivo* se determinó que la zona apical y media de la hoja son las que poseen una mayor acumulación de compuestos fenólicos. Los resultados señalados anteriormente, son de gran utilidad para la obtención de extractos fenólicos, que pueden ser utilizados con diferentes fines.

En relación a los cultivares estudiados, los resultados indican que 'Cambur Manzano' tanto *in vivo* como *in vitro* posee una mayor cantidad de fenoles, lo que podría ser de utilidad en estudios relativos a la tolerancia ante el ataque de patógenos, y su posible empleo con aplicaciones terapéuticas.

Los resultados obtenidos en la investigación, revisten gran importancia para procesos de mejoramiento en musáceas, ya que los fenoles además de cumplir un papel primordial en los mecanismos de defensa constitutivos que operan en forma constante en la planta, también pueden ser usados en aplicaciones terapéuticas, por lo cual, es importante continuar realizando investigaciones en ésta área, a fin de aplicarlas en procesos de mejoramiento a futuro.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT) y al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) por su apoyo en la ejecución de esta investigación.

LITERATURA CITADA

Albornoz, A. 1997. Medicina tradicional herbaria. Editado por Instituto Farmacoterápico Latino S.A. Caracas, Venezuela. 431 p.

Álvaro, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175. Disponible en línea: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf [Ene. 20, 2014].

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official Methods of Analysis of AOAC

International. *Food Chemistry*. 34(2):823-826.

Bailey, P. y C. Bailey. 1998. *Química orgánica: conceptos y aplicaciones*. 5ta edición. Editorial Pearson Education. 267 p.

Castañeda, B., R. Manrique y L. Ibañez. 1995. Estudio fitoquímico y farmacológico de plantas con efectos hipolipemiente. *Acta médica Sanmartiniana*. 1(1):104-111. Disponible en línea: http://www.medicina.usmp.edu.pe/actamedica/2012_I/Art1_Vol1_N20.pdf [Ene. 15, 2014].

Chavarría, D. y G. López. 2010. Micropropagación de ápices caulinares en plátano (*Musa* spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante. Trabajo de grado para obtener el título de ingeniero agrónomo generalista. Departamento de producción vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. Disponible en línea: <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf02c512m.pdf> [Ene. 16, 2014].

Devouard, A. 2001. "Muchos usos de *Musa*". Red Internacional para el mejoramiento del Banano y Plátano. INIBAP. Montpellier, Francia. 105 p.

Domingo, D. y M. López. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Esp. Quimioterap.* 16(4):385-393. Disponible en línea: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf> [Ene. 20, 2012].

Drago, M., M. López y T. Sainz. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 37(4):58-68. Disponible en línea: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/579/57937408.pdf> [Ene. 15, 2012].

Florio, A. 1997. Estudio comparativo de la composición fenólica de clones de *Musa acuminata* de diferente ploidía. Trabajo de grado para optar el título de licenciado de Biología. Universidad Simón Bolívar. 96 p.

Galindo, W., M. Rosales, E. Murgueitio y J. Larrahondo. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock research*

- for rural development. 1(1). Disponible en línea: <http://www.lrrd.org/lrrd1/1/mauricio.htm> [Mar. 02, 2012].
- Hernández, E., M. Soto, J. Rodríguez y T. Colinas. 2002. Contenido de fenoles y actividad enzimática asociados con el daño provocado por cenicilla en hojas de durazno. *Revista fitotecnia mexicana*. 25(2):153-159 Disponible en línea: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/25-2/5a.pdf> [Mar. 03, 2012].
- Hinojosa, J., M. Gutiérrez, F. Siller, A. Rodríguez, J. Morales, P. Guerrero y C. Del Toro. 2012. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. *Revista de ciencias biológicas y de la salud*. 15(2):53-60. Disponible en línea: <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/23-Articulo%209%20Biotecnia%20XV%202.pdf> [Ene. 16, 2014].
- Jiménez, G. 1997. Conferencias del Curso Internacional de Propagación *in vitro* de especies vegetales. Instituto de Biotecnología para las Plantas (IBP), Santa Clara, Cuba. pp. 127-134.
- Martínez, G., R. Pargas, y E. Manzanilla. 1999. Los mil y un uso de las musáceas y plantas afines. FONAIAP Divulga. N° 62. Disponible en línea: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd62/musa.html [Mar. 03, 2012].
- Nicholson, R. 1990. La bioquímica de resistencia a las enfermedades de las plantas, un desafío para la biotecnología y fitopatología. CENICAFE. Chinchiná Colombia. pp. 204-206. Disponible en línea: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CAFE.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mnf=009641> [Ene. 15, 2014].
- Paladino, S. 2008. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas VID (*Vitis vinifera* L.). Trabajo de grado para optar el título de Magister en alimentos. Mención ciencias. Postgrado Regional Cooperativo en Alimentos. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. 100 p. Disponible en línea: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2627/tesispaladino.pdf [Ene. 15, 2012].
- Pardo, A. y M. Ruíz. 2005. Análisis de datos con SPSS 13 Base. Editorial Mc Graw Hill. Madrid, España. 620 p.
- Pasto, D. y C. Jhonson. 1981. Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverté. 1era edición. Madrid, España. 416 p.
- Pérez, M. R., C. C. Rodríguez, G. Martínez y D. Horta. 2002. Efecto antiinflamatorio del extracto de *Musa paradisiaca* L. (Acitan®) Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM). Habana, Cuba. 1 p. Disponible en línea: <http://www.labiofam.cu/UserFiles/File/productos/antitumorales/acitan.pdf> [Dic. 12, 2010].
- Proestos, C., N. Chorianopoulos, G. J. E. Nychas and M. Komaitis. 2005. RP- HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53:1190-1195.
- Torres, J., H. A. Rodríguez, E. Rodríguez y R. Arango. 2009. Aspectos bioquímicos de la resistencia del banano *Musa acuminata* al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis*. *Revista Tumbaga*. 4:85-96.
- Vásquez, R., L. Ruesga, R. D'Addosio, G. Páez y M. Marín. 2008. Extracción de pectina a partir de la cáscara de plátano (*Musa AAB*, subgrupo plátano) clon Hartón. *Revista de Facultad de Agronomía. (LUZ)*. 25:318-333. Disponible en línea: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037878182008000200008 [Dic. 12, 2010].
- Veitia, M. 1999. Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos. Postgrado de Fitopatología. Universidad Agraria de la Habana (UNAH). Cuba. 7 p.
- Velioglu, Y. S., G. Mazza, L. Gao and B. D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46:4113-4117.

Marcadores bioquímicos y moleculares asociados a la tolerancia al estrés hídrico en arroz

Biochemists and molecular markers associated with water stress tolerance in rice

Gelis T. Torrealba-Núñez^{1*}, Iris Pérez-Almeida², Catalina Ramis³, Nelly Delgado⁴, Luis Angulo³, Yreny K. De Faria³, Carlos Marín², Oralys C. León Brito⁵ y Getssy C. Martínez Zapata¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Guárico), ²Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), ³Universidad Central de Venezuela (UCV), Maracay, Estado Aragua. ⁴INIA-Portuguesa, ⁵INIA-Monagas. *Correos electrónicos: gelistorrealbaarroz@gmail.com, gtorrealba@inia.gov.ve

RESUMEN

En Venezuela, la sequía se ha convertido en un factor limitante para la producción arrocería nacional. Las variedades cultivadas tradicionalmente están adaptadas a una alta suplencia de agua. Esta investigación tuvo como propósito identificar marcadores bioquímicos (isoenzimas) y moleculares (microsatélites SSR) asociados a la tolerancia al estrés hídrico en arroz (*Oryza sativa* L.). El estudio de cartografía génica fue realizado en una población RC₁F₂ producto del cruce (LO2 x Fonaiap 2000) x LO2, empleando el programa MapDisto y el método de un marcador a la vez. Se identificaron 89 caracteres cuantitativos (QTL) putativos asociados a las características de la fase vegetativa, reproductivas y de rendimiento; usando cinco isoenzimas (PRX, G6PDH, ACP, 6PGD, SDH) y 40 (SSR) se estimaron los índices de susceptibilidad a la sequía (ISS). Seguidamente, se identificó la asociación entre las isoenzimas, la tolerancia al estrés hídrico y los ISS en las familias de la población segregante, para variables relacionadas a la fase vegetativa, reproductiva y de maduración del grano de arroz. En los 2 grupos de ligamiento (cromosoma 3 y 9) se detectaron 4 QTL asociados a los ISS, 2 regiones asociadas con la floración al 50%, 1 para el desgrane (cromosoma 3) y 1 para la fertilidad (cromosoma 9) en RM107, RM442 y RM570. Esta información puede ser empleada como criterio en la selección asistida por medio de marcadores moleculares, en los futuros programas de mejoramiento genético del arroz, a fin de identificar familias y genotipos tolerantes a la condición de estrés hídrico.

Palabras clave: *Oryza sativa* L., sequía, producción, isoenzimas, microsatélites.

Recibido: 07/05/14

ABSTRACT

Drought in Venezuela has become a limiting factor for national rice production, as the cultivated varieties traditionally are adapted to high water supply. This study aimed to identify biochemical (isozymes) and molecular markers (microsatellites, SSR) associated with water stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Gene mapping study was conducted in a BC₁F₂ population product of the crossing (LO2 x Fonaiap 2000) x LO2 using the MapDisto program and the method of one marker at a time. 89 putative quantitative characters (QTLs) associated with vegetative, reproductive and yield traits were identified. Using five isozymes (PRX, G6PDH, ACP, 6PGD and SDH) and 40 SSR drought susceptibility indexes (ISS) were estimated. Next, the association between isoenzymes, water stress tolerance and ISS in the families of the segregating population was identified for variables related to the vegetative, reproductive and maturation of the grain phase in rice. In the 2 linkage groups (chromosome 3 and 9) 4 QTL associated to ISS, 2 regions associated with 50% flowering, 1 for desgrane (chromosome 3) and 1 for fertility (chromosome 9) were detected in RM107, RM442 and RM570. This information can be used as a criterion in molecular marker assisted selection in future rice breeding programs in order to identify families and genotypes tolerant to the water stress condition.

Key words: *Oryza sativa* L., drought, production, Isozymes, microsatellite.

INTRODUCCIÓN

La escasez de agua es uno de los grandes retos que afronta la humanidad, elemento muy abundante en el planeta Tierra. Sin embargo, el 97% del total está formada por agua salada perteneciente a mares y océanos, el restante 3% formado por agua dulce, está poco disponible, porque se encuentra congelada (Cortés, 2004).

La agricultura es la actividad de mayor consumo de agua dulce del planeta, utilizando aproximadamente el 70% del agua potable. Algunos países en desarrollo destinan cerca de 90% del líquido a esta importante actividad. Se estima que para producir un kilo de arroz se necesitan de 1 a 3 m³ de agua, de allí la importancia de un manejo sostenible de los recursos hídricos, para asegurar el abastecimiento de alimentos y mitigar los efectos del cambio climático (FAO, 2002).

En Venezuela, la sequía se ha convertido en un factor limitante para la producción arrocería nacional, las variedades de arroz cultivadas tradicionalmente están adaptadas a una alta suplencia de agua. Sin embargo, instituciones del país como el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), la Universidad Central de Venezuela (UCV), y el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) a través de investigadores en el área, han realizado estudios para conocer la respuesta de los diferentes genotipos de arroz frente al déficit hídrico (Ghneim *et al.*, 2005; Ghneim-Herrera 2006; Pieters y Núñez 2008; García 2008 y Torrealba *et al.*, 2010).

La tolerancia a la sequía es una característica compleja, expresada por la acción e interacción de diferentes caracteres: morfológicos (sistema radical eficiente, reducción del macollamiento, entre otros); y comportamientos fisiológicos (reducción de la transpiración, alta eficiencia en el uso del agua, cierre estomático, ajuste osmótico), controlados por numerosos genes. La obtención de cultivares de arroz tolerantes a la sequía es un objetivo claro de los programas de mejoramiento genético, como alternativa para el aumento y mantenimiento de la productividad nacional del arroz, como rubro estratégico para la alimentación nacional.

En vista de la complejidad del control genético de las características asociadas a la tolerancia

al estrés por déficit hídrico, se ha propuesto la aplicación de la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) para una mayor eficacia y eficiencia del proceso de selección.

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que se encuentran en determinados lugares del genoma; y se definen como características heredables que permiten clasificar el genotipo de un individuo, identificando regiones del genoma asociadas con un carácter fenotípico cuantitativo específico (QTL). La identificación del QTL es de gran utilidad en plantas, ya que permite la manipulación de características agronómicas como el rendimiento, la calidad nutricional y la floración, entre otros (Grandillo y Tanksley, 1996). Las bases de detección de los QTL son la identificación de las asociaciones entre fenotipos determinados genéticamente y marcadores genéticos específicos (McCouch y Doerge, 1995).

Teng *et al.* (2002) empleando una variedad indica (Zhaile Ye Quing8), una japónica (Jing Xi 17) y sus dobles haploides, lograron identificar 2 QTL: qDR-5 y qDR-12 para tolerancia a la sequía en arroz. Más recientemente, Vikram *et al.* (2011) encontraron un QTL (qDTY 1.1) asociado a la tolerancia a la sequía en cuanto a la producción de grano ubicado en el cromosoma 1, flanqueado por los microsatélites RM11943 y RM431, de efecto mayor y consistente en cuanto a su expresión en diferentes ambientes.

Aunque no se han identificado isoenzimas asociadas a características cuantitativas relacionadas con la tolerancia al déficit hídrico, se espera obtener cierta relación con distintas isoformas de enzimas vitales para la producción de granos. El grupo de isoenzimas de la glutamina sintetasa (GS) son responsables de la asimilación y movilización dentro de la planta de las distintas fuentes de nitrógeno (N). Existen formas de GS, tanto en cloroplastos como en citosol; en el caso del arroz se conocen tres isoformas del citosol.

Bajo estrés por déficit hídrico, tanto las isoenzimas de GS de cloroplasto como del citosol son afectadas, lo que disminuye la tasa de asimilación de N en forma de amonio, y en consecuencia al llenado de granos (Swarbreck *et al.*, 2011). Se espera que las plantas con alguna isoforma más tolerante al estrés hídrico,

permita a la planta un mejor comportamiento bajo esas condiciones, evidenciado en un mayor rendimiento.

Por otra parte, Lee *et al.* (2007), propusieron que las enzimas relacionadas al proceso de lignificación, responsables de los mecanismos de tolerancia a diferentes estrés, son activadas por el estrés causado por el déficit hídrico. En ese sentido, encontraron en trébol que las enzimas peroxidasa eran impulsadas bajo condiciones de sequía, con reducción de la biomasa foliar.

En vista de la importancia del cultivo de arroz para el país y el uso eficiente del recurso hídrico, el objetivo del presente estudio fue identificar marcadores bioquímicos y moleculares asociados a la tolerancia al estrés hídrico en arroz con fines de selección.

MATERIALES Y MÉTODOS

La identificación de QTL asociados a caracteres fenotípicos relacionados a la tolerancia al déficit hídrico se llevó a cabo en cuatro etapas, que comprenden: la creación de una población segregante a partir del cruce entre progenitores contrastantes en cuanto al comportamiento fenotípico; la evaluación fenotípica de la población segregante obtenida bajo condiciones con o sin estrés por déficit hídrico (Torrealba, 2010; Torrealba *et al.*, 2010); la selección de marcadores polimórficos entre los dos progenitores y; finalmente, el estudio de segregación y asociación de los marcadores con los caracteres fenotípicos.

Estas dos últimas etapas, correspondientes al análisis molecular, se llevaron a cabo en el Laboratorio de genética molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, núcleo Maracay.

Material vegetal

Se empleó una población RC_1F_2 del cruce (LO2 x Fonaiap 2000) x LO2, conformada por 149 familias, desarrollada por Torrealba (2010) en el campo experimental de INIA Guárico, Bancos de San Pedro, bajo la metodología de Torrealba *et al.* (2010), considerando las características asociadas al estrés hídrico, señaladas por Babu *et al.* (2002), Toorchi *et al.* (2002), Courtois y Lafitte

(2003). Esto permitió escoger dos progenitores contrastantes en su respuesta al estrés hídrico, medida a través del ISS de Fischer y Maurer (1978) para enrollamiento de la hoja, secado de la hoja y fertilidad de las espiguillas.

Se consideraron variables de crecimiento vegetativo y reproductivo para determinar los ISS (Torrealba, 2010): 1. altura de planta; 2. ejerción de la panícula; 3. ácame; 4. enrollamiento de la hoja; 5. secado de la hoja; 6. longitud de la panícula; 7. promedio de panículas/planta; 8. número de hijos/planta; 9. contenido relativo de agua en las hojas; 10. temperatura de la hoja; 11. coeficiente de clorofila; 12. índice de área foliar; 13. longitud de las raíces; 14. volumen radical; 15. relación parte aérea y parte radical; 16. biomasa; 17. peso seco parte aérea; 18. peso seco de raíces; 19. floración al 50%; 20. floración como relación granos llenos y granos vanos; 21. senescencia; 22. fertilidad; y 23. aceptación fenotípica.

Con relación al rendimiento, se tomó en cuenta: 1. desgrane de la panícula; 2. número de granos llenos; 3. número de granos vanos; 4. peso de granos llenos; 5. peso de granos vanos; 6. peso de 1000 g; 7. índice de cosecha; y 8. rendimiento ($g\ m^{-2}$).

Evaluación molecular

Se evaluó el polimorfismo entre los progenitores utilizando 15 sistemas de marcadores isoenzimáticos (SMI) y 258 SSR distribuidos en todo el genoma. Para los SMI se utilizaron plúmulas de 4 a 15 días de edad, de acuerdo a la metodología empleada en arroz por Ortiz *et al.* (2002), abreviatura y código por Manchenko (1994).

Los marcadores fueron los siguientes: (1) Glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI: 5.3.1.9); (2) glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH: 1.1.1.49); (3) 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD: 1.1.1.44); (4) fosfatasa ácida (ACP: 3.1.3.2); (5) alfa-esterasa (α EST: 3.1.1); (6) beta-esterasa (β EST: 3.1.1); (7) glutamato deshidrogenasa (GDH: 1.4.1.2); (8) malato deshidrogenasa (MDH: 1.1.1.37); (9) enzima málica (ME: 1.1.1.40); (10) fosfogluconato Isomerasa D-glucosa-6-fosfato (PGI: 5.3.1.9); (11) peroxidasa (PRX: 1.11.1.7); (12) siquimato deshidrogenasa (SDH: 1.1.1.25); (13) alcohol deshidrogenasa (ADH: 1.1.1.1); (14) isocitrato deshidrogenasa (IDH: 1.1.1.42); y (15)

fosfoglucomutasa (PGM: 2.7.5.1), en un sistema discontinuo de electroforesis en geles de policrilamida (6/10%) bajo condiciones nativas (PAGE), siguiendo la metodología descrita por Ortiz *et al.* (2004) y Velásquez (2001).

Los SSR fueron seleccionados de la base de datos de GRAMENE (McCouch *et al.*, 2002) y Plantmarkers (Rudd *et al.*, 2005).

Seguidamente, a fines de realizar la mini preparación de ADN y visualizado en geles de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio (10 mg ml^{-1}) el ADN fue obtenido siguiendo el método de Zambrano *et al.* (2002), cuantificando la cantidad de ADN a partir del Fago Lambda de concentración conocida. La reacción en cadena de polimerasa (PCR), los ciclos en el termociclador MJ Research PTC-200 y la tinción de los geles de poliácridamida al 6%, fueron realizadas siguiendo la metodología descrita por Pérez-Almeida *et al.* (2011).

Análisis estadístico

Empleando el programa MapDisto, versión 1.7 (Lorieux, 2008), se procedió a verificar la segregación mendeliana (1:1), correspondiente a una retrocruza, para cada marcador molecular y la información genotípica de las 149 familias RC_1F_2 . Asimismo, con este programa se realizó el mapeo y la identificación de los grupos de ligamiento a partir de los alelos presentes de cada genotipo para cada marcador molecular polimórfico.

Fue utilizado el método de mapeo para un marcador a la vez, como lo indica Xiao *et al.* (1998); Thomson *et al.* (2003); Septiningshigh *et al.* (2003); Wan *et al.* (2005); Lee *et al.* (2005) y Praddep *et al.* (2005). Este método fue empleado por el bajo número de marcadores polimórficos detectados entre los progenitores. Se consideró la existencia de un QTL y la asociación entre el valor fenotípico de cada ISS de las 31 variables evaluadas por Torrealba (2010) y el locus de cada marcador molecular, para un valor mínimo de LOD Score de 3,0 y fracción de recombinación de 0,35.

Nomenclatura para QTL

Los caracteres cuantitativos (QTL) fueron nombrados de acuerdo a la nomenclatura descrita por McCouch *et al.* (1997), utilizando dos letras abreviadas de las características de

estudio, seguida por el número del cromosoma donde fue detectado el QTL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del polimorfismo

De los 15 sistemas de marcadores isoenzimáticos sólo 7 resultaron polimórficos: G6PDH: 1.1.1.49; 6PGD: 1.1.1.44; ACP: 3.1.3.2; α EST: 3.1.1; β EST: 3.1.1; PRX: 1.11.1.7 y SDH: 1.1.1.25. De esos marcadores se seleccionaron: ACP, PRX, G6PDH, 6PGD y SDH, por su resolución, calidad de los geles y visualización de las bandas obtenidas. En la evaluación del polimorfismo de los SSR, 66 fueron polimórficos; de los cuales se utilizaron 52 por sus características de discriminación entre los progenitores (Cuadros 1a y 1b).

Verificación de la segregación mendeliana

De los 57 marcadores moleculares evaluados en la prueba de bondad de ajuste de Ji-cuadrado (Cuadro 2), sólo dos no segregaron en las proporciones esperadas para una retrocruza (1:1). La distorsión en la segregación es muy común en los estudios de mapeo, señalada para la mayoría de los marcadores genéticos, como: desviaciones estadísticas; tipo de población de estudio; causas biológicas, como irregularidades durante la meiosis, competencia entre las gametas durante la fertilización o incompatibilidad genética; y por la cercanía de los marcadores al centrómero (Praddep *et al.*, 2005; Semagn *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006).

Mapeo y grupos de ligamiento

No se identificó ningún grupo de ligamiento con los marcadores isoenzimáticos, mientras que seis de los SSR pudieron ser asignados en tres grupos. El primer grupo de ligamiento estuvo conformado por los marcadores RM278 y RM107; el segundo por RM201 y RM309 y el tercero por los marcadores RM570 y RM442.

Asociación entre marcadores moleculares y variables del estrés hídrico

Se identificaron 89 QTL putativos asociados a las características de la fase vegetativa, reproductiva y rendimiento (Cuadro 3). Es importante destacar la presencia de ocho asociaciones entre los marcadores bioquímicos

Cuadro 1a. Microsatélites polimórficos entre los parentales Fonaiap 2000 y LO2, ubicados en los cromosomas 1, 2, 3, 4 y 5, alelos observados, pares de bases (pb) y secuencia sentido y antisentido.

SSR	C	Motivo repetido	Sentido	Antisentido	F2000	pb	LO2	pb
RM220	1	(CT)17	ggaaggaactgttccaac	gaaatgctcccacatgtct	aa	106	bb	93
RM490	1	(CT)13	atctgcacactgcaaacacc	agcaagcagtgctttcagag	aa	90	bb	83
RM575	1	(AG)24	caatttccataggctgcatg	gcttgggttagcgacgac	aa	306	bb	286
RM259	1	(CT)17	tggagttgagaggagg	ctgttgcagtggtccatgt	bb	154	aa	158
RM243	1	(CT)18	gatctgcagactgcagttgc	agctgcaacgatgtgtcc	bb	101	aa	103
RM237	1	(CT)18	caaatcccactgctgtcc	tgggaagagagcactacagc	aa	130	bb	122
RM71	2	(ATT)10T(ATT)4	ctagaggcgaaaacgagatg	gggtggcgaggtaataatg	aa	141	bb	131
RM324	2	(CAT)21	ctgattccacacactgtgc	gattccacgtcaggatcttc	bb	150	aa	167
RM290	2	(GA)12	accctattctgctctctc	gtgctgtagatggaagggag	aa	177	bb	167
RM262	2	(CT)16	cattccgtctcggctcaact	cagagcaaggtggcttgc	aa	148	bb	145
RM450	2	(AG)17	aaaccacagtagtacccgg	tccatccacatctccctctc	aa	220	bb	213
RM526	2	(TAAT)5	cccaagcaatacgtccctag	acctggtcatgacaaggagg	aa	219	bb	220
RM207	2	(CT)25	ccattcgtgagaagatctga	cacctcatctcgtaacgcc	bb	115	aa	135
RM3639	2	(GA)13	catggccaatctagctagc	tgcaactctgcaactccaag	bb	115	aa	120
RM231	3	(CT)16	cagattattctgaggtc	cacttgcatagtctgcattg	aa	132	bb	130
RM251	3	(CT)29	gaatggcaatggcgctag	atgcggtcaagattcgatc	bb	141	aa	148
RM282	3	(GA)15	ctgtgtcgaaggctgcac	cagtcctgtgtgcagcaag	bb	102	aa	108
RM148	3	(TG)12	atacaacattaggatgaggctgg	tccttaaagggtgcaatgag	aa	114	bb	106
RM55	3	(GA)17	ccgtcgcgtagtagagaag	tcccggttatttaaggcg	aa	225	bb	215
RM570	3	(AG)15	gtcttcaactcccagtgcg	tgacgatgtggaagagcaag	aa	256	bb	271
RM442	3	(AAG)10	cttaagccgatgcatgaagg	atcctatcgacgaatgcacc	aa	261	bb	250
RM119	4	(GTC)6	catccccctgctgctgctg	cgccggatgtgtggactagcg	bb	149	aa	153
RM273	4	(GA)11	gaagccgtcgtgaagtacc	gttctctactgatcgcgac	bb	238	aa	250
RM470	4	(CTT)14	tctcatcggcttctcttc	agaaccggttctactgcacg	aa	115	bb	109
RM303	4	[AC(AT)2-10] 9(GT)7(ATGT)6	gcatggccaatattaaagg	gggtggaatagaagtccggt	aa	182	bb	180
RM252	4	(CT)19	ttcgtgacgtgataggtg	atgactgatccccgagaacg	bb	199	aa	219
RM169	5	(GA)12	tggctggctccgtggtagctg	tcccgttccgttcatccctcc	aa	169	bb	152
RM164	5	(GT)16TT(GT)4	tctgcccgtcactgcagatatcc	gcagccctaagtctacaattcttc	aa	261	bb	242
RM87	5	(CTT)3T(CTT)11	cctctccgatacccgatg	gcgaaggtagcaaaaggaaag	bb	170	aa	174

Fonaiap 2000 (F2000), línea de observación 2 (LO2), pares de bases (pb) y ubicación en el genoma cromosoma (C).

Cuadro 1b. Microsatélites polimórficos entre los parentales Fonaiap 2000 y LO2, ubicados en el cromosomas 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, alelos observados, pares de bases (pb) y secuencia sentido y antisentido.

SSR	C	Motivo repetido	Sentido	Antisentido	F2000	pb	LO2	pb
RM121	6	(CT)7	accgctgcctccactttcccc	ttcgggggtgccggtgatgttg	bb	209	aa	233
RM539	6	(TAT)21	gagcgtcctgttaaaccg	agtagggtatcacgcatccg	aa	331	bb	320
RM336	7	(CTT)18	cttacagaaaacggcatcg	gctggtttgttcaggttcg	aa	199	bb	178
RM478	7	(AG)12	cagctggggaagagagagag	tcagaaactaaacgcacccc	aa	210	bb	226
RM25	8	(GA)18	ggaagaatgatctttcatgg	ctaccatcaaaaccaatgttc	bb	153	aa	161
RM444	9	(AT)12	gctccacctgctaagcatc	tgaagaccatgttgcagg	aa	199	bb	177
RM105	9	(CCT)6	gtcgtcgaccatcggagccac	tggtcgaggtggggatcgggtc	bb	115	aa	123
RM278	9	(GA)17	gtagtgagcctaacaataatc	tcaactcagcatctctgtcc	bb	139	aa	155
RM107	9	(GA)7	agatcgaagcatcgcgccgag	actcgtcctctgggttcccgg	bb	320	aa	335
RM222	10	(CT)18	cttaaatgggccacatgcg	caaagcttcggccaaaag	aa	235	bb	224
RM216	10	(CT)18	gcatggccgatggtaaag	tgtataaaaccacacggcca	aa	114	bb	110
RM239	10	(AG)5TG(AG)2	tacaaaatgctgggtacccc	acatatgggacccacctgtc	aa	143	bb	141
RM311	10	(GT)3(GTAT)8(GT)5	tggtagtataggtactaaacat	tcctatacacatacaaacatac	bb	311	aa	333
RM228	10	(CA)6(GA)36	ctggccattagtccttg	gcttgcggctctcttac	bb	95	aa	152
RM21	11	(GA)18	acagtattccgtaggcacgg	gctccatgagggtagtagag	aa	190	bb	168
RM224	11	(AAG)8(AG)13	atcgatcgatcttcacgagg	tgctataaaaggcattcggg	aa	156	bb	152
RM201	11	(CT)17	ctcgtttattacctacagtacc	ctacctccttctagaccgata	bb	128	aa	158
RM20	12	(ATT)14	atctgtccctgcaggatcat	gaaacagaggcacatttcattg	aa	253	bb	227
RM247	12	(CT)16	tagtgccgatcgatgaacg	catatggtttgacaaagcg	aa	132	bb	127
RM277	12	(GA)11	cggtcaaatcatcacctgac	caaggcttgaaggaag	bb	116	aa	127
RM309	12	(GT)13	gtagatcacgcaccttctgg	agaaggcctccggtgaag	aa	155	bb	150
RM17	12	(GA)21	tgccctgttatttctctctc	ggtgatccttcccatttca	aa	200	bb	152
RM235	12	(CT)24	agaagctagggttaacgaac	tcacctggtcagcctctttc	bb	263	aa	272

Fonaiap 2000 (F2000), línea de observación 2 (LO2), pares de bases (pb) y ubicación en el genoma cromosoma (C).

y los índices de susceptibilidad a la sequía (ISS): G6PDH al coeficiente de clorofila y peso seco (radical); ACP y el índice de área foliar; 6PGD para la fertilidad, número de granos vanos y peso seco (radical); y SDH al peso de 1000 g.

Con respecto a la peroxidasa (PRX) se encontró asociación con el contenido relativo de agua en las hojas y floración 50%, coincidiendo con lo planteado por Lee *et al.* (2007) en vista de su intervención en el proceso de lignificación

como una respuesta al estrés por déficit hídrico. Esto indica la importancia del uso de este tipo de marcador en la identificación de caracteres cuantitativos.

Con 40 SSR se detectaron 65 QTL putativos para las variables evaluadas. El RM231 (cromosoma 3) mostró asociación para la excursión de la panícula y enrollamiento de la hoja; RM290 (cromosoma 2) para las variables enrollamiento de las hojas y el contenido relativo

Cuadro 2. Segregación Ji-Cuadrado (X^2) para 57 marcadores moleculares, de la retrocruza (LO2xF 2000xLO2).

N°	Marcador	$X^2_{1:1}$	P		N°	Marcador	$X^2_{1:1}$	P	
1	RM17	0,48	0,486	ns	30	RM259	1,57	0,210	ns
2	RM20	0,25	0,617	ns	31	RM262	0,35	0,553	ns
3	RM21	0,95	0,329	ns	32	RM273	0,01	0,933	ns
4	RM25	0,35	0,556	ns	33	RM277	1,20	0,274	ns
5	RM55	3,08	0,079	ns	34	RM278	0,46	0,496	ns
6	RM71	2,46	0,117	ns	35	RM282	0,26	0,612	ns
7	RM87	0,11	0,737	ns	36	RM290	2,22	0,136	ns
8	RM105	1,20	0,274	ns	37	RM303	1,20	0,274	ns
9	RM107	0,70	0,401	ns	38	RM309	1,80	0,179	ns
10	RM119	1,15	0,284	ns	39	RM311	0,03	0,865	ns
11	RM121	2,25	0,134	ns	40	RM324	1,36	0,243	ns
12	RM148	2,19	0,139	ns	41	RM336	3,75	0,053	ns
13	RM164	0,03	0,868	ns	42	RM442	1,36	0,243	ns
14	RM169	0,25	0,620	ns	43	RM444	0,56	0,455	ns
15	RM201	7,95	0,005	**	44	RM450	0,01	0,931	ns
16	RM207	2,02	0,155	ns	45	RM470	1,07	0,300	ns
17	RM216	0,70	0,401	ns	46	RM478	1,22	0,270	ns
18	RM220	2,19	0,139	ns	47	RM490	0,56	0,455	ns
19	RM222	3,32	0,069	ns	48	RM526	0,86	0,354	ns
20	RM224	0,99	0,321	ns	49	RM539	0,17	0,682	ns
21	RM228	2,42	0,120	ns	50	RM570	4,06	0,044	*
22	RM231	0,11	0,737	ns	51	RM575	1,20	0,274	ns
23	RM235	2,22	0,136	ns	52	RM3639	0,17	0,676	ns
24	RM237	1,51	0,219	ns	53	α -ACP	0,11	0,735	ns
25	RM239	0,33	0,564	ns	54	POX	0,01	0,935	ns
26	RM243	0,83	0,361	ns	55	6-GPH	0,33	0,566	ns
27	RM247	0,11	0,737	ns	56	6-PGD	0,00	1,000	ns
28	RM251	0,01	0,932	ns	57	SDH	0,54	0,461	ns
29	RM252	0,56	0,455	ns					

Cuadro 3. Asociación entre los índices de susceptibilidad a la sequía y marcadores moleculares.

Nº	Característica	QTL	Cromosoma	Locus	Prueba de F
1	Acame	aca1	1	RM575	4,44*
2	Acame	aca5	5	RM169	3,94*
3	Acame	aca11	11	RM21	6,19*
4	Aceptación fenotípica	acf6	6	RM539	5,23*
5	Altura de planta	alp1	1	RM259	6,02*
6	Altura de planta	alp5	5	RM164	7,64**
7	Altura de planta	alp9	9	RM444	4,42*
8	Altura de planta	alp10	10	RM239	5,62*
9	Biomasa	bma2	2	RM207	5,11*
10	Biomasa	bma3	3	RM251	4,34*
11	Biomasa	bma5	5	RM87	5,51*
12	Biomasa	bma12	12	RM277	4,46*
13	Coefficiente de clorofila	ccr	-	G6PDH	4,26*
14	Contenido relativo de agua en las hojas	cra2	2	RM290	4,47*
15	Contenido relativo de agua en las hojas	cra9	9	RM105	8,42*
16	Contenido relativo de agua en las hojas	cra12	12	RM20	3,97*
17	Contenido relativo de agua en las hojas	cra	-	PRX	5,56*
18	Desgrane	dgn1	1	RM259	5,24*
19	Desgrane	dgn3	3	RM442	8,30**
20	Desgrane	dgn9	9	RM444	4,01*
21	Desgrane	dgn12	12	RM20	7,22**
22	Excursión de la Panícula	exp3	3	RM231	3,91*
23	Excursión de la Panícula	exp4	4	RM237	3,98*
24	Fertilidad	fer3	3	RM55	5,31*
25	Fertilidad	fer6	6	RM539	5,82*
26	Fertilidad	fer9	9	RM107	4,74*
27	Fertilidad	fer	-	6PGD	6,43*
28	Floración 50%	flr1	1	RM259	5,16*
29	Floración 50%	flr2	2	RM71	4,32*
30	Floración 50%	flr3	3	RM55	3,92*
31	Floración 50%	flr3	3	RM442	6,12*
32	Floración 50%	flr3	3	RM570	4,93*
33	Floración 50%	flr7	7	RM336	10,57**
34	Floración 50%	flr	-	PRX	5,17*
35	Índice de área foliar	iaf1	1	RM575	5,38*
36	Índice de área foliar	iaf3	3	RM282	4,03*
37	Índice de área foliar	iaf5	5	RM164	4,78*
38	Índice de área foliar	iaf12	12	RM235	4,41*
39	Índice de área foliar	iaf12	12	RM247	6,07*
40	Índice de área foliar	iaf	-	ACP	4,10*
41	Índice de área foliar	ico1	1	RM575	5,88*

.../... Continúa

.../... continuación Cuadro 3.

Nº	Característica	QTL	Cromosoma	Locus	Prueba de F
42	Índice de área foliar	ico4	4	RM273	4,69*
43	Índice de área foliar	ico8	8	RM25	4,40*
44	Longitud de la Panícula	Inp1	1	RM243	5,31*
45	Longitud de la Panícula	Inp2	2	RM526	4,54*
46	Longitud de la Panícula	Inp7	7	RM336	4,14*
47	Longitud de la Panícula	Inp8	8	RM25	5,87*
48	Longitud de la Panícula	Inp12	12	RM235	3,94*
49	Longitud de la Panícula	Inr1	1	RM220	10,33**
50	Longitud de la Panícula	Inr2	2	RM324	7,34**
51	Longitud de la Panícula	Inr7	7	RM336	3,93*
52	Longitud de la Panícula	Inr7	8	RM25	5,16*
53	Número de granos llenos por planta	ngl1	1	RM220	4,93*
54	Número de granos llenos por planta	ngl2	2	RM450	5,19*
55	Número de granos llenos por planta	ngl10	10	RM228	4,45*
56	Número de granos llenos por planta	ngl12	12	RM277	10,92**
57	Número de granos llenos por planta	ngv	-	6PGD	5,35*
58	Número de Hijos	nhj3	3	RM231	4,60*
59	Peso de 1.000 granos	pgr	-	SDH	5,94*
60	Peso de granos llenos	pgl1	1	RM220	6,09*
61	Peso de granos llenos	pgl2	2	RM450	4,89*
62	Peso de granos llenos	pgl12	12	RM247	4,60*
63	Peso de granos llenos	pgl12	12	RM277	8,00**
64	Peso de granos vanos	pgv2	2	RM71	4,79*
65	Peso seco parte aérea	psa4	4	RM252	5,32*
66	Peso seco parte aérea	psa10	10	RM222	5,72*
67	Peso seco parte aérea	psa11	11	RM21	5,52*
68	Peso seco parte radical	psr2	2	RM262	4,09*
69	Peso seco parte radical	psr11	11	RM21	7,43**
70	Peso seco parte radical	psr	-	6PGD	6,67*
71	Promedio de panículas	pan6	6	RM121	4,41*
72	Promedio de panículas	pan10	10	RM239	4,27*
73	Relación peso seco (aérea)/ peso seco (radical)	rps2	2	RM324	4,66*
74	Relación peso seco (aérea)/ peso seco (radical)	rps10	10	RM228	4,10*
75	Relación peso seco (aérea)/ peso seco (radical)	rps11	11	RM21	11,07**
76	Rendimiento de arroz paddy (g 5m ⁻²)	rap3	3	RM251	6,20*
77	Rendimiento de arroz paddy (g 5m ⁻²)	rap6	6	RM539	4,23*
78	Rendimiento de arroz paddy (g 5m ⁻²)	rap9	9	RM444	4,21*

.../... Continúa

.../... continuación Cuadro 3.

Nº	Característica	QTL	Cromosoma	Locus	Prueba de F
79	Senescencia de la hoja	sns6	6	RM539	8,00**
80	Senescencia de la hoja	sns12	12	RM17	9,01**
81	Temperatura de la hoja	tho2	2	RM262	4,08*
82	Temperatura de la hoja	tho8	8	RM25	5,08*
83	Volumen radical	vlr1	1	RM220	4,31*
84	Volumen radical	vlr1	1	RM575	4,30*
85	Volumen radical	vlr2	2	RM324	4,94*
86	Volumen radical	vlr4	4	RM303	5,60*
87	Volumen radical	vlr7	7	RM336	3,92*
88	Volumen radical	vlr8	8	RM25	4,27*
89	Volumen radical	vlr12	12	4,27*	7,41**

Asociación significativa* (P<0,05) y altamente significativa** (P<0,01).

de agua en las hojas. Lafitte *et al.* (2004) en su evaluación de líneas recombinantes de arroz detectaron QTL asociados al contenido relativo de agua en las hojas y su correlación a las características de floración y radiación solar; así como, la correlación entre las variables de la fase vegetativa, altura de la planta y rendimiento en grano en condiciones de estrés hídrico.

Se asoció la variable volumen radical con 7 microsatélites en distintos cromosomas: RM17 (cromosoma 12); RM220 y RM575 (cromosoma 1); RM324 (cromosoma 2); RM303 (cromosoma 4); RM336 y RM25 de los cromosomas 7 y 8, respectivamente. La característica longitud de las raíces fue asociada a 4 SSR: RM220 (cromosoma 1) altamente significativo, RM324 (cromosoma 2) altamente significativo, RM336 (cromosoma 7) y RM25 (cromosoma 8).

Del mismo modo, fueron detectadas asociaciones entre las variables de la fase reproductiva del arroz; por ejemplo, la variable senescencia fue altamente significativa para los microsatélites RM17 (cromosoma 12) y RM539 (cromosoma 6) mostrando este último, asociación significativa con las características de aceptación fenotípica y fertilidad.

La variable floración 50% fue asociada con los microsatélites: RM259 (cromosomas 1); RM71 (cromosoma 2); RM55, RM442 y RM570 (cromosoma 3) y RM336 del cromosoma 7. Se señala que la floración es un indicador de la respuesta de la planta a la condición de estrés

hídrico, así como el contenido relativo de agua en la hoja. Fue detectado también una región en el cromosoma 1 del arroz (gen *sd1*) asociada al estrés hídrico para el contenido relativo de agua en la hoja y correlacionada a la floración; dos QTL asociados a la floración; 1 QTL a la altura de la planta y otro (RM212) a longitud de la panícula (Lafitte *et al.*, 2004).

Seguidamente, fue determinada una asociación altamente significativa para el desgrane en los SSR RM20 (cromosoma 12) y RM442 (cromosoma 3); número de granos por planta, RM277 (cromosoma 12) y el peso de granos llenos por planta. Hubo asociación para el número de granos por planta y el peso de granos por planta: RM220 (cromosoma 1), RM277 (cromosoma 12) y RM450 (cromosoma 2).

Los resultados sugieren la importancia de incorporar algunas técnicas de biología molecular como herramienta en los programas de mejoramiento genético, para el estudio de características asociadas a la tolerancia al estrés hídrico, señalado por Mackill (2003).

En el presente estudio se detectaron 89 QTL individuales, 54 relacionados con la fase vegetativa (60,67%), 14 para la fase reproductiva (15,73%) y 21 al rendimiento (23,60%), los cuales son comparables con los resultados obtenidos por Yue *et al.* (2005). Se detectaron, además un total de 39 QTL individuales para las características relacionadas con el índice de respuesta a la sequía: área foliar, longitud de

las raíces (fase vegetativa); floración, fertilidad (fase reproductiva del cultivo) y potencial de rendimiento en arroz; en una población de 180 familias híbridas recombinantes.

El ISS empleado para la identificación de los QTL, mostró ser un indicador preciso para reconocer la habilidad intrínseca de los genotipos de las familias RC_1F_2 , para superar el estrés por el déficit de agua, bajo las condiciones del cultivo en campo y las bases genéticas del estrés a la sequía. RM220, RM259 y RM575 fueron los marcadores más asociados a los índices de susceptibilidad a la sequía.

En el análisis de QTL detectados por grupos de ligamientos, se identificaron cuatro asociaciones, una en el cromosoma 9 y tres regiones en el cromosoma 3, para RM107, RM442, RM570 y las variables de fertilidad, desgrane de la panícula y floración al 50% (Figura y Cuadro 4).

Las características de desgrane y floración al 50% fueron altamente significativas en la asociación con los SSR del cromosoma 3. El valor de la fracción de recombinación para los

marcadores microsatélites RM107 y RM278 fue 0,328 y 0,299 para RM442 y RM470. Los valores de LOD Score en ambos grupos de ligamiento fueron mayores a 3, lo cual es un indicativo de la significancia del análisis realizado, demostrado por Thomson *et al.* (2003) y Septiningshigh *et al.* (2003) para los criterios del análisis de asociación entre marcadores moleculares y caracteres cuantitativos.

Se identificaron 2 regiones en el cromosoma 3 asociadas con floración al 50% para RM442 y RM570, como lo reportado por Lanceras *et al.* (2004). La distancia entre RM442 y RM570 fue de 34,5 cm; entre RM107 y RM278 fue de 39,3 cm; en ambos casos menores a 50 cm, lo cual es un indicativo de que estos marcadores, se encuentran ligados, confirmando la utilidad de los SSR en estudios de asociación a la tolerancia al estrés hídrico en las etapas vegetativas y reproductivas (Sarkarung, 2002; Toojinda, 2002).

Brondani *et al.* (2002) y Lafitte *et al.* (2004) asociaron un QTL en el cromosoma 3 para la floración, resultado que confirma el QTL detectado en la presente investigación. La

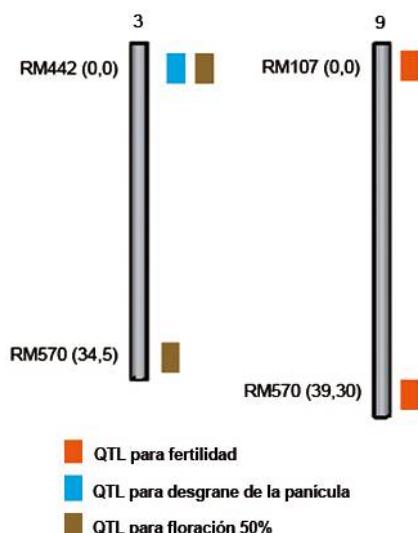


Figura. Mapa de asociación y localización en el genoma de QTL para las características fertilidad, desgrane de la panícula y floración al 50%. Grupo de ligamiento 1 (cromosoma 9), grupo de ligamiento 3 (cromosoma 3).

Cuadro 4. Características asociadas con QTL por grupos de ligamiento, valores de F, fracción de recombinación (r) y LOD Score detectados en las familias RC₁F₂ del cruce entre Fonaiap 2000 y LO2.

Grupo de ligamiento	Locus	Característica asociada	F	r	LOD Score
1	RM107	Fertilidad	4,74*	0,33	3,43
	RM278				
3	RM442	Desgrane de la panícula	8,30**	0,30	4,93
	RM570	Floración 50%	4,93*		
	RM442		6,12*		

*Significativa (P<0,05); **altamente significativa (P<0,01).

floración ha sido considerada como una variable secundaria asociada a la tolerancia al estrés hídrico. Se han encontrado variaciones entre líneas evaluadas bajo condiciones de estrés hídrico, para la floración al 50%. Esta característica puede ser un criterio de selección e identificación de materiales en sus programas de mejoramiento para la tolerancia a la sequía (Lafitte *et al.*, 2003).

La floración es un carácter importante de adaptación de los cultivos y el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés hídrico es muy sensible que afecta un componente significativo del rendimiento, como lo es el porcentaje de fertilidad de las espiguillas (Takahashi *et al.*, 2001).

En el cromosoma 9 se identificó un QTL para la fertilidad de la panícula asociada al marcador RM107. Resultado similar fue encontrado por Temnykh *et al.* (2001), Mei *et al.* (2005) y Lang y Buu (2008), quienes detectaron QTL's altamente significativos para esa característica en el mismo cromosoma. El estrés hídrico reduce del 10 al 16% la fertilidad de las espiguillas y el número de granos por panícula; es decir, la fertilidad y la floración son afectadas por la sequía, su evaluación da información de las respuestas de los genotipos a la condición de estrés. Estas respuestas son el resultado integral de muchos procesos que ocurren durante el establecimiento en campo, desarrollo vegetativo, reproductivo y cosecha de los materiales (Babu *et al.*, 2002).

La característica desgrane fue asociada al marcador RM442 (cromosoma 3). Según el porcentaje de desgrane del material genético,

se pueden producir pérdidas de rendimiento de grano en el campo (Quirós, 2003). La disminución del desgrane de la panícula ha sido resultado de la domesticación del arroz, facilitando así la cosecha (Acevedo *et al.*, 2006).

CONCLUSIÓN

Se identificó asociación entre las isoenzimas PRX, G6PDH, ACP, 6PGD, SDH, la tolerancia al estrés hídrico y los índices de susceptibilidad a la sequía en las familias de la población segregante, para variables relacionadas a la fase vegetativa, reproductiva y de maduración del grano del arroz; confirmando así la utilidad de estos marcadores aplicados a estudios de mapeo y cartografía genética.

Los índices de susceptibilidad a la sequía también fueron identificados en los marcadores tipo microsatélites para características asociadas al estrés hídrico. Su información puede ser empleada como criterio en la selección asistida por medio de marcadores moleculares en los futuros programas de mejoramiento genético del arroz, con la finalidad de identificar familias y genotipos tolerantes a la condición de estrés.

Los resultados constituyen un punto de partida para el posible desarrollo de tecnologías en el cultivo de arroz para afrontar condiciones de bajo suministro de agua, nuevas formas de manejo agronómico del recurso agua, así como la obtención de variedades cuya respuesta al déficit hídrico les permita alcanzar un adecuado desempeño agronómico, en rendimiento y calidad de grano.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, M., W. Castrillo y U. Belmonte. 2006. Origen, evolución y diversidad del arroz. Trabajo Especial. Agronomía Tropical. 56(2):151-170.
- Babu, R., P. Shanmugasundaram, P. Chezian, B. Nguyen, P. Jayaprakash, S. Ganesh, V. Chamarek, A. Palchamy, S. Sadasivam, S. Sarkarung, L. Wade and H. Nguyen. 2002. Molecular Dissection of Drought Tolerance in rice: Association between Physiomorphological Traits and Field Performance. In: Field screening for drought tolerance in Crop Plants with Emphasis on Rice. Proceedings of an International Workshop on Field Screening for Drought Tolerance in Rice, 11-14 December 2000, ICRISAT, Patancheru, India. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India, and the Rockefeller Foundation, New York. pp. 82-87.
- Brondani, C., N. Rangel, V. Brondani and E. Ferreira. 2002. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics. 104:1192-1203.
- Courtois, B. and R. Lafitte. 2003. Using market-aided selection for a specific drought-tolerance trait. In: Breeding Rice for drought-prone environments. Edited by Fischer, K.S; R., Lafitte; S., Fukai; G., Atlin y B. Gardí. International Rice Research Institute (IRRI), Philippines. pp. 84-89.
- Courtois B., D. Filloux, N. Ahmadi, J-L. Noyer, C. Billot y E.P. Guimarães. 2003. Uso de marcadores moleculares para el manejo de poblaciones de arroz mejoradas mediante selección recurrente. pp. 53-76. In: Mejoramiento poblacional, una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina. Editor, E.P. Guimarães. CIAT-Colombia. 374 p.
- Cortés, J. 2004. El Agua en el Mundo: Cooperación y Conflicto. In: Observatori Solidaritat UB. Disponible en línea: <http://www.solidaritat.ub.edu/observatori/esp/itinerarios/agua/agua.htm>. [Abr. 08, 2014].
- FAO. (Food and Agriculture Organization) 2002. El agua: un recurso inapreciable y limitado. Enfoques. Disponible en línea: <http://www.fao.org/AG/esp/revista/0210sp1.htm>. [Abr. 08, 2014].
- Fischer, R. and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses, Aust. J. Agric. Res. 29(5):897-912.
- García, F. 2008. Caracterización morfoanatómica de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de estrés hídrico. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 89 p.
- Ghneim, T., P. Alejandro, I. Pérez, G. Torrealba, C. Martínez, M. Lorieux and J. Tohme. 2005. Plant Breeding News, Edition 160 10. An Electronic Newsletter of Applied Plant Breeding by FAO and Cornell University.
- Ghneim-Herrera, T., A. Rosales, M. Aguilar, P. Alejandro J., I. Pérez-Almeida y G. Torrealba. 2006. Identificación de cultivares de arroz con alta capacidad de ajuste osmótico para el mejoramiento genético de la tolerancia a la sequía. Agronomía Tropical. 56(4):677-687.
- Grandillo, S. y S. Tanksley. 1996. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. Theoretical and Applied Genetics. 92:935-951.
- Lanceras, J., G. Pantuwan, B. Jongdee and T. Toojinda. 2004. Quantitative Trait Loci Associated with Drought Tolerance at Reproductive Stage in Rice. Plant Physiology. 135(1):384-399.
- Lang, N. and B. Buu. 2008. Fine mapping for drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) Omonrice. 16:9-15.
- Lafitte, H., A. Blum and G. Atlin. 2003. Using secondary traits to help identify drought-tolerant genotypes. IRRI: Breeding Rice for Drought-Prone Environments. pp. 37-48.
- Lafitte, H., A. Price and B. Courtois. 2004. Yield response to water deficit in an upland rice

- mapping population: Associations among traits and genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 109(6):1237-1246.
- Lee, S., C. Oh, J. Suh, S. McCouch and S. Ahn. 2005. Identification of QTLs for domestication – related and agronomic traits in an *Oryza sativa* x *Oryza rufipogon* BC₁F₇ population. *Plant Breeding*. 124:209-219.
- Lee, B. K., K. Y. Kim, W. J. Jung, J. C. Avice, A. Ourry and T. H. Kim 2007. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*. 58(6):1271-1279.
- Lorieux, M. 2008. *MapDistoGenetics Software*, version 1.7. IRD-CIAT.
- Mackill, D. 2003. What molecular tools are available for selection for drought tolerance? Section 4.4 Breeding Rice for Drought - Prone Environments. IRRI. pp. 55-61.
- Manchenko, G. 1994. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic gels. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 341 p.
- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, L. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*. 9:199-207.
- McCouch, S., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. Cho, N. Huang, T. Ishii and M. Blair. 1997. "Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding". *Plant Molecular Biology*. 35:89-99.
- McCouch, S. and R. Doerge. 1995. QTL mapping in rice. *Trends and Genetics*. 11(12):482-487.
- Mei, H., Q. Shu, Y. Wang, C. Ying, Z. Li, L. Guo, X. Yu and L. Luo. 2005. Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two backcross populations. *Theoretical and Applied Genetics*. 110:649-659.
- Ortiz, A., O. Gómez y C. Ramis, C. 2004. Caracterización bioquímica de poblaciones del complejo de maleza arroz rojo en Venezuela. *Agronomía Trop*. 54(3):257-273.
- Ortiz, A., C. Ramis, P. Parra, A. Díaz y L. López. 2002. Patrones isoenzimáticos de variedades de arroz y arroces rojos en Venezuela. *Revista Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV)*. 28:117-130.
- Pérez-Almeida, I., E. Torres, L. Angulo y M. Acevedo. 2011. Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores moleculares microsatélites (SSR). *Interciencia*. 36(7):545-551.
- Pieters, A. J. and M. Núñez. 2008. Photosynthesis, water use efficiency and $\delta^{13}C$ in two rice genotypes with contrasting response to water deficit. *Photosynthetica*. 46(4):574-580.
- Praddep, M., N. Sarla, L. Reddy and E. Siddiq. 2005. Identification and mapping of yield and yield relative QTLs from an Indian accession of *Oryza rufipogon*. *BMC Genetics*. BioMed Central. Research article. Available online: <http://www.biomedcentral.com>. [Abr. 08, 2014].
- Quirós, E. 2003. Evaluación morfológica y molecular de líneas avanzadas de mejoramiento genético de arroz (*Oryza sativa*) del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Tesis para optar al título de maestría. Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 136 p.
- Rudd, S., H. Schoof and K. Mayer. 2005. Plant Markers a database of predicted molecular markers from plants. *Nucleic Acids Research*. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Abr. 10, 2014].
- Sarkarung, S. 2002. A regional breeding program to develop drought - tolerant rainfed lowland

- germplasm: IRRI's experience in South and Southeast Asia. *Breeding Rice for Drought - Prone Environments*. IRRI. pp. 70-74.
- Semagn, K., A. Bjornstad and N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular markers methods for plants. *African Journal of Biotechnology*. 5(25):2540-2568.
- Septiningsih, E., J. Prasetyono, E. Lubis, T. Tai, T. Tjubaryat, S. Moeljopaeiro and S. McCouch. 2003. Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. *Theoretical and Applied Genetics*. 107:1419-1432.
- Swarbreck, S., M. Defoin-Platel, M. Hindle, M. Saqi and D. Habash. 2011. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *Journal of Experimental Botany*. 62(4):1511-1522.
- Takahashi, Y., A. Shomura, T. Sasaki and M. Yanos. 2001. *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the α subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad USA*. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC354444/> 98(14):7922-7927. [Abr. 08, 2014].
- Temnykh, S., W. Ayres, N. Cartinhour, S. Hauck, L. Lipovich, Y. Cho, T. Ishii and S. McCouch. 2001. Mapping and genome organization of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 100(5):697-712.
- Teng, S., Q. Qian, D. L. Zeng, Y. Kunihiro, K. Fujimoto, D. N Huang and L. H Zhu. 2002. Analysis of gene loci and epistasis for drought tolerance in seedling stage of rice (*O. sativa* L.) Yi Chuan Xue Bao. Available online: www.ncbi.nlm.nih.gov. 29(3):235-240.
- Toojinda, T. 2002. Molecular genetics of submergence tolerance in rice: Quantitative trait loci (QTL) analysis of traits associated with submergence tolerance. *Annals Botan.*
- Thomson, M., T. Tai, A. McClung, X.-H. Lai, M. Hinga, K. Lobos, Y. Xu, C. Martínez and S. McCouch. 2003. Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. *Theoretical and Applied Genetics*. 107(3):479-493.
- Toorchi, M., H. Shashidhar, N. Sharma and S. Hittalmani. 2002. Tagging QTLs for maximum root length in rainfed lowland rice (*Oryza sativa* L.) using molecular markers. *Cell Molecular Biology Lett*. 7(2B):771-776.
- Torrealba, G. 2010. Identificación de marcadores moleculares asociados a la tolerancia al estrés hídrico en arroz (*Oryza sativa* L.). Trabajo para optar al título de doctora en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía. Maracay. 199 p.
- Torrealba, G., I. Pérez, N. Delgado, C. Ramis, L. Angulo, O. León, M. Muñoz y G. Martínez. 2010. Metodología de campo para evaluación de tolerancia al estrés hídrico en el cultivo arroz. *INIA Divulga*. 16:23-26.
- Velásquez, R. 2001. Control genético de tres sistemas isoenzimáticos en arroz (*Oryza sativa* L.). Trabajo de ascenso a Asistente. Maracay. Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía. 57 p.
- Vikram, P., BP. Mallikarjuna, S. Dixit, H. Uddin, MT. Sta Cruz, A. Kumar and Kumar. A. 2011. qDTY1.1, a major QTL for rice grain yield under reproductive-stage drought stress with a consistent effect in multiple elite genetic backgrounds. *BMC Genetics*. 12:89-104.
- Wan, X., J. Wan, J. Weng, L. Jiang, J. Bi, C. Wang and H. Zhai. 2005. Stability of QTLs for rice grain dimension and endosperm chalkiness characteristics across eight environments. 2005. *Theoretical and Applied Genetics*. 110(7):1334-1346.
- Xiao, J., J. Li, S. Grandillo, S. Ahn, L. Yuan, S. D Tanksley and McCouch S. 1998. Identification of trait improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics*. 150(2):899-909.

- Yue, B., L.Xiong, W. Xue, Y. Xing, L. Luo and C. Xu. 2005. Genetic analysis for drought resistance of rice at reproductive stage in field with different types of soil. *Theoretical and Applied Genetics*. 111:1127-1136.
- Zambrano, A., J. Demey, G., Martínez, F. Fuenmayor, Z. Gutiérrez, G. Saldaña y M. Torrealba. 2002. Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Agronomía Trop*. 52(2): 235-243.
- Zhao, B., M. Deng, Q. Zhang, J. Li, S. Ye, Y. Liang, Y. Peng and P. Li. 2006. Analysis of Segregation Distortion of Molecular Markers in F₂ Population of Rice. *Acta Genetic Sinica*. 33(5):449-457.

Diversidad genética de especies de *Rubus* determinada mediante RAPD

Genetic diversity of *Rubus* species determined by RAPD

Sara Roa^{1*}, Hilda Fernández², Luís Castro² y Nora Useche¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Táchira). ²Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). *Correos electrónicos: sroa@inia.gov.ve; sararoadelgado@gmail.com

RESUMEN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia de las Rosáceas y comprende numerosas especies cultivadas y silvestres. En Venezuela se cultiva la especie *R. glaucus* en los estados Táchira, Mérida, Trujillo, Lara y Aragua. Algunas especies silvestres promisorias crecen cercanas a *R. glaucus*, entre ellas *R. idaeus* conocida como frambuesa. La falta de variedades comerciales de mora, así como la preservación de especies silvestres, plantea la necesidad de realizar mejoramiento genético. El objetivo de este trabajo fue la amplificación del ADN mediante marcadores RAPD en especies del género *Rubus* de los estados Táchira y Aragua, para determinar la diversidad genética. El ADN se extrajo de hojas frescas de *R. glaucus*, *R. idaeus* y *Rubus* spp. Se utilizaron 23 iniciadores RAPD y se seleccionaron OPA10, OPA18, OPW06, OPB09, OPM10, OPK20, que produjeron 44 bandas de las cuales 38 fueron polimórficas. El iniciador OPW06 resultó el más informativo con un PIC de 0,38. Los análisis de agrupamiento y coordenadas principales coincidieron, discriminando la especie *R. idaeus* del resto de las especies, como también separaron los genotipos del estado Aragua de los del estado Táchira. La similitud entre genotipos en un mismo estado, sugiere la probable influencia del cruce de polen entre especies silvestres y cultivadas, así como el intercambio de material de propagación clonal utilizado por los productores. Estos resultados podrán ser utilizados en programas de conservación de especies y mejoramiento genético que incluyan cruzamientos interespecíficos.

Palabras clave: *Rubus glaucus* Benth, *Rubus idaeus* L., mora, especies silvestres, ADN, marcadores moleculares.

ABSTRACT

The andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) belongs to the family *Rosaceae*, which includes many cultivated and wild species. In Venezuela *R. glaucus*, is cultivated in Táchira, Mérida, Trujillo, Lara and Aragua states. Promising wild species grow close to *R. glaucus*, including *R. idaeus* known as raspberry. Lack of commercial varieties of blackberry, as well as for the preservation of wild species, raises the need for genetic improvement. The objective of this work was the amplification of DNA by RAPD markers in species of the genus *Rubus* of Táchira and Aragua states, to determine the genetic diversity. DNA was extracted from fresh leaves of *R. glaucus*, *R. idaeus* and *Rubus* spp. 23 RAPD primers were used, and OPA10, OPA18, OPW06, OPB09, OPM10, OPK20 were selected, which produced 44 bands of which 38 were polymorphic. OPW06 was the most informative initiator with a PIC of 0.38. The cluster analysis and principal coordinates separated the species *R. idaeus*, other species and also discriminated species from Táchira state with regard to Aragua state. The similarity between genotypes in the same state indicates a probable influence of pollen exchange between wild and cultivated species, as well as the exchange of clonal propagated materials used by the producers. These results may be used in conservation of species and genetic improvement that includes interspecific crosses.

Key words: *Rubus glaucus* Benth, *Rubus idaeus* L., blackberry, wild species, ADN, molecular markers.

INTRODUCCIÓN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia *Rosaceae*, del género *Rubus*, cuyas numerosas especies se consiguen en altitudes que comprenden desde el nivel del mar hasta los 4500 m.s.n.m. (Marulanda *et al.*, 2007). El género *Rubus* posee un importante número de especies en el reino vegetal, con aproximadamente 700 a nivel mundial, entre ellas se encuentra *R. glaucus*, llamada mora de castilla, con frutos denominados comúnmente como moras.

Entre las especies más destacadas de este género se encuentran *Rubus idaeus* L. cuyo fruto se conoce como frambuesa o “raspberry”, así como diferentes *Rubus* cultivadas o “zarzas” que producen frutos denominados “blackberrys” o “zarzamoras”.

La mora de castilla (*R. glaucus*) cultivada en Venezuela, es considerada un híbrido, pues combina características de los subgéneros *Idaeobatus* y *Rubus*, además de ser un anfidiplóide fértil (Jennings, 1998; citado por Marulanda *et al.*, 2007).

El cultivo de la mora de castilla es importante, tanto desde el punto de vista nutricional, por sus propiedades antioxidantes, como en lo que al aspecto económico se refiere.

Para los productores de la región andina este cultivo, representa su principal fuente de ingresos, algunas veces su base de subsistencia, por ser una fuente de empleo que incluye la mano de obra familiar, aunado a los ingresos que genera en forma continua a través de la comercialización semanal de la fruta fresca o procesada, artesanal o industrial.

Las plantaciones comerciales de mora de castilla en el país están localizadas en los estados Aragua, Barinas, Mérida, Táchira y Trujillo.

En Venezuela, la falta de variedades comerciales de mora y otras especies de *Rubus* a los fines de satisfacer las necesidades de productores y consumidores, así como la preservación de especies silvestres, ha motivado el interés de mejorarla genéticamente, por lo que se requiere conocer la diversidad genética de la especie.

La diversidad genética dentro de una especie o entre especies puede medirse de diferentes formas, la más común es mediante descriptores morfológicos. Sin embargo, los resultados pueden ser influenciados por el medio ambiente. Otras formas más eficientes y certeras para medir la diversidad genética son los marcadores moleculares. Las aplicaciones de los marcadores moleculares como los RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico) utilizados en este trabajo, han sido documentadas en especies frutales (Azofeifa, 2006).

Con relación al uso de los RAPD en *Rubus*, Graham y McNicol (1995), midieron la habilidad de estos marcadores para determinar las relaciones genéticas entre genotipos emparentados y no emparentados de *Rubus* spp., concluyeron que todos los marcadores resultaron idóneos, ya que fueron polimórficos y detectaron las diferencias entre los materiales estudiados.

Patamsytë *et al.* (2005 y 2008) estudiaron la diversidad genética de una colección de 49 accesiones de *Rubus idaeus* usando características morfológicas y RAPD. El dendrograma resultante mostró un alto nivel de variación genética entre accesiones.

Por su parte, Gee-Suck *et al.* (2011), utilizando marcadores RAPD con el propósito de obtener información filogenética de la especie conocida en Corea como zarzamora coreana cultivada (KCB) y cinco especies más, concluyeron que las accesiones KCB exhiben más parentesco o cercanía genética con la especie *R. occidentalis* que con la especie *R. coreanus*.

Investigadores venezolanos como Fernández *et al.* (2010) usaron marcadores RAPD para estimar las relaciones genéticas de poblaciones de girasol, derivadas de cruces interespecíficos; Pérez-Almedida *et al.* (2010) para analizar la diversidad genética en seis especies de *Passiflora* spp. y Gutiérrez y Rincón (2011), para determinar la diversidad de una colección de germoplasma de caraota.

El objetivo de este trabajo fue la amplificación del ADN mediante marcadores RAPD en especies del género *Rubus* de los estados Táchira y Aragua, a fin de determinar la diversidad genética presente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Consistió en muestras de hojas jóvenes de plantas de las especies *Rubus glaucus*, *Rubus* spp. y *Rubus idaeus*. En el Cuadro 1 se observa la ubicación de los sitios de muestreo de los diferentes genotipos y su condición de silvestres o cultivados.

Extracción y cuantificación de ADN genómico

Luego de la colecta en campo, las muestras se trasladaron en cava refrigerada hasta el laboratorio donde fueron lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente, colocadas en papel de aluminio y guardadas en cava a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

Para la extracción de ADN se pesó 0,1 g de cada muestra, se maseó en un mortero con nitrógeno líquido y se transfirieron a un tubo Eppendorf. La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo de extracción del Kit PROMEGA®.

La evaluación de calidad del ADN fue realizado mediante gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis horizontal Bio-Rad Power PAC 3000, a 100 voltios y 50 miliamperios, durante media hora, utilizando Buffer TBE 0,5 X (54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5 M). En cada pozo del gel se cargaron 2 μl de ADN más 1 μl de Buffer de carga. La

concentración de ADN ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) y la pureza se determinaron con el equipo Spectrophotometro Nano Drop 1000. Los ADN se diluyeron hasta la concentración de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ con Buffer TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA). Las muestras de ADN fueron conservadas a -20°C .

Amplificación del ADN

Para la amplificación del ADN se utilizaron los marcadores moleculares RAPD: OPA02, OPA04, OPA08, OPA09, OPA10, OPA11, OPA12, OPA13, OPA14, OPA15, OPA16, OPA18, OPA20, OPB06, OPB08, OPB09, OPF13, OPF14, OPF17, OPM04, OPM10, OPW06 y OPK20. Los ciclos PCR se realizaron en un Termociclador MJ Research modelo PTC-200, siguiendo el programa consistente en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 44 ciclos de 93°C durante 30 s, luego 36°C durante 30 s, seguido de 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min. Cada reacción se desarrolló en un volumen final de 15 μl compuesto por 1,17 μl de MgCl (2,5 mM); 2,23 μl de Buffer (10X); 1,56 μl de dNTPs (200 mM); 2,7 μl de iniciador (0,4 μM); 0,3 μl de Taq polimerasa (5 U μl^{-1}); 2 μl de ADN ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) y 3,46 μl de H_2O .

Electroforesis de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular PROMEGA® de

Cuadro 1. Genotipos del género *Rubus* analizados por RAPD.

Genotipo	Especie	Latitud	Longitud	m.s.n.m.	Condición	Ubicación geográfica
1	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 08,3"	72° 20' 30"	1822	cultivado	Táchira
2	<i>R. glaucus</i>	7° 33' 11"	72° 25' 53,4"	1924	cultivado	Táchira
3	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 08,3"	72° 20' 30,2"	1822	cultivado	Táchira
4	<i>R. glaucus</i>	10° 24' 21,67"	67° 17' 21,7"	1789	cultivado	Aragua
5	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 08,3"	72° 20' 30"	1822	silvestre	Táchira
6	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 17,3"	72° 20' 32,4"	1796	cultivado	Táchira
7	<i>Rubus</i> spp.	8° 0' 52,7"	72° 8' 26,5"	2328	silvestre	Táchira
8	<i>R. glaucus</i>	10° 24' 21,67"	67° 17' 21,7"	1789	cultivado	Aragua
9	<i>R. idaeus</i>	8° 15' 33,89"	77° 54' 42,63"	2388	silvestre	Táchira
10	<i>Rubus</i> spp.	8° 0' 52,7"	72° 8' 26,5"	2328	silvestre	Táchira

25 pb para establecer por comparación el peso molecular de los diferentes alelos. Para observar las bandas en los geles fue utilizado el equipo Gel-Doc XR Imagen Sistem Bio-Rad, software Quantity One versión 4.2.

Análisis de los datos

Con los patrones de bandas obtenidos se construyó una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0) de banda. Para evaluar la capacidad de los marcadores en la detección de loci polimórficos fue calculado el contenido de información polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés) de cada marcador, propuesto (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000) con la fórmula $PIC = 2 \sum f_i (1 - f_i)$. Dónde: PIC = PIC del marcador i; f_i = frecuencia de las bandas donde está presente el marcador; $(1 - f_i)$ = frecuencia de las bandas ausentes del marcador.

Las relaciones genéticas entre los diferentes genotipos fueron estimadas usando el coeficiente de similaridad de DICE de acuerdo con Laurentin (2009) y se representaron en un dendrograma obtenido con el método UPGMA usando el algoritmo pares de grupos. Fue calculado el coeficiente de correlación cofenética como medida de la confiabilidad del análisis de agrupamiento UPGMA (Rohlf y Sokal, 1981). Adicionalmente, los datos se sometieron a un

análisis de coordenadas principales (Sneath y Sokal, 1973) y analizados con los programas PAST versión 2.17 (Hammer *et al.*, 2001) e InfoStat, 2011.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede apreciarse en el Cuadro 2, los valores obtenidos para las concentraciones del ADN estuvieron entre 524 y 2253,6 ng μl^{-1} , muy superiores a los requeridos para efectuar la reacción PCR (20 ng μl^{-1}), permitiendo garantizar la amplificación del ADN en la reacción de PCR.

De los 23 iniciadores probados, se seleccionaron seis para ser utilizados en este análisis, debido a que mostraron buena resolución y bandas polimórficas. Con los iniciadores utilizados se obtuvieron 44 bandas, de las cuales 38 fueron polimórficas. El número de alelos por iniciador se ubicó entre 3 y 10 con un promedio de 7,33 alelos. El PIC promedio fue de 0,35. El valor más alto de PIC fue 0,38 obtenido para el iniciador OPW06, el cual presentó 10 alelos (Cuadro 3).

Al analizar separadamente los datos obtenidos con los iniciadores OPA18 y OPW06, se observó que los mismos permitieron separar los genotipos de las especies de *R. glaucus* provenientes del estado Aragua y *R. idaeus*, de los otros genotipos estudiados, lo cual evidenció

Cuadro 2. Características del ADN extraído de las muestras de *Rubus*.

Genotipo	Especie	ng μl^{-1}	Pureza
1	<i>Rubus glaucus</i>	524,0	1,46
2	<i>Rubus glaucus</i>	1015,3	1,69
3	<i>Rubus glaucus</i>	2217,4	1,20
4	<i>Rubus glaucus</i>	2253,6	1,13
5	<i>Rubus glaucus</i>	688,1	1,26
6	<i>Rubus glaucus</i>	1179,4	1,24
7	<i>Rubus spp.</i>	1135,2	1,09
8	<i>Rubus glaucus</i>	2004,6	1,11
9	<i>Rubus idaeus</i>	589,0	1,19
10	<i>Rubus spp.</i>	1139,0	1,12

Cuadro 3. Valores de PIC y números de bandas obtenidas para los seis iniciadores RAPD utilizados.

Iniciador	Secuencia	PIC promedio	No. de bandas
OPA10	GTGATCGCAG	0,37	9
OPA18	AGGTGACCGT	0,35	10
OPW06	TTTGGGCCCC	0,38	10
OPB09	TGGGGGACTC	0,36	3
OPM10	TCTGGCGCAC	0,35	5
OPK20	GTGTCGCGAG	0,29	7

el poder de estos marcadores para discriminar genotipos de *Rubus*. En la Figura 1, se observa el perfil de bandas obtenidas con el iniciador OPA18.

El análisis de agrupamiento mostró la formación de cuatro grupos, como se puede apreciar en el dendrograma (Figura 2). El primer grupo estuvo conformado por los genotipos 1, 2 y 3 de la especie *R. glaucus*, provenientes de los campos de productores en San Vicente de la Revancha, ubicado en el parque nacional El Tamá, municipio Junín en la zona suroeste del estado Táchira.

El segundo grupo estuvo integrado por los genotipos 5 y 6 (*R. glaucus*), igualmente provenientes de San Vicente de la Revancha, caracterizados por presentar tallos cilíndricos, hojas compuestas de tres folíolos con espinas en los tallos y en el envés de las hojas, frutos tipo drupas adheridas a un receptáculo común (al cual permanecieron adheridas cuando se cosecharon), forma cónica y color morado; también, los genotipos silvestres 7 y 10 (*Rubus* spp.) provenientes de la localidad de Los Loros en el municipio Michelena en el noroeste del estado Táchira, los cuales presentaron tallos decumbentes, angulosos, pubescentes, hojas compuestas de 3 y 5 folíolos, espinas en tallos y envés de las hojas, y frutos redondeados de color púrpura.

El tercer grupo lo integraron los genotipos 4 y 8 (*R. glaucus*) procedentes de la Colonia Tovar en el estado Aragua. Finalmente, el cuarto grupo correspondió al genotipo 9 o especie silvestre *R. idaeus*, colectada en la localidad de Pueblo

Hondo en el municipio Jáuregui al noreste del estado Táchira. Las plantas de esta especie presentaron tallos erectos, cilíndricos, con espinas, hojas compuestas de 7 u 8 folíolos, y drupas de color rojo que se desprendieron del receptáculo cuando se cosecharon (Roa, 2014).

Por otra parte, en el dendrograma se observa que las especies de *R. glaucus* (1, 2 y 3) procedentes del estado Táchira se ubicaron más cercanas a *R. idaeus* (9); esto pudiera explicarse debido a que las especies silvestres *R. idaeus* y *Rubus* spp. se consiguen en las mismas zonas de cultivo que *R. glaucus* en el estado Táchira, existiendo la posibilidad de intercambio de polen, dado que la especie es alógama, ocurriendo fijación de caracteres por el intercambio de material vegetativo clonal a través de estacas por parte de los productores de los diferentes municipios.

La similitud entre las muestras de *R. glaucus* del estado Aragua resultó más alta que entre las muestras del estado Táchira, debido, probablemente a la predominancia de una propagación de tipo asexual, tal como opinan los autores Marulanda y Márquez (2002), Graham y McNicol (1995) y Pardo *et al.* (2009), quienes concluyeron que el análisis con RAPD, permitió diferenciar las accesiones según su lugar de procedencia geográfica, aunque la variabilidad dentro de éstas no fue alta. Esto hace suponer que el modo de reproducción clonal de la especie por parte de los productores ha contribuido a mantener la similitud entre los individuos por zonas geográficas.

La separación en grupos dentro de la especie *R. glaucus* sugiere que los materiales de un mismo

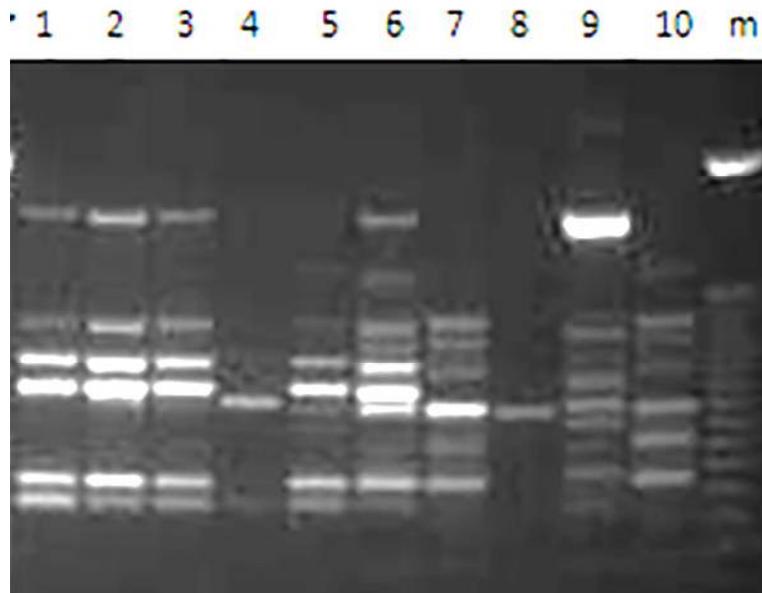


Figura 1. Perfil RAPD con el iniciador OPA18 para los 10 genotipos de *Rubus* analizados. Carriles 1, 2 y 3 = *R. glaucus* de Táchira; 4 = *R. glaucus* Colonia Tovar (Aragua); 5 y 6 = *R. glaucus* de Táchira; 7 = *Rubus* spp.; 8 = *R. glaucus* Colonia Tovar (Aragua); 9 = *R. idaeus*; y 10 = *Rubus* spp.; m = marcador.

grupo pudieran ser considerados como de un mismo pedigrí, lo cual coincide con lo señalado por Badjakov *et al.* (2006) quienes concluyeron que los marcadores RAPD fueron eficientes para discriminar materiales élite de frambuesa con un pedigrí común.

El genotipo 9 correspondiente a la especie *R. idaeus*, se separó totalmente del resto de los otros genotipos, es decir, con el análisis RAPD se logró distinguir completamente la frambuesa (*R. idaeus*) de las moras (*R. glaucus* y *Rubus* spp.), en forma similar como lo señalado por Han-Wu *et al.* (2009), y Stafne *et al.* (2003), quienes determinaron las relaciones genéticas entre genotipos de *Rubus* y distinguieron totalmente los “raspberry” (frambuesas) de los “blackberry” (moras).

Otros autores también lograron diferenciar entre *R. glaucus* y *Rubus* spp. (Marulanda y Márquez, 2001) al estudiar la diversidad genética de accesiones de estas especies. Igualmente, Salazar *et al.* (2006) demostraron el poder discriminante que tienen los marcadores moleculares RAPD para estudios de diversidad genética. Esta habilidad o poder de los

marcadores RAPD para discriminar genotipos, puede ser aprovechada para identificar y seleccionar materiales que luego podrían ser usados en cruces interespecíficos (Antonius y Nybom, 1995; Moore y Trople, 1999; Lee *et al.*, 2012; Harshman, 2012; Bushakra *et al.*, 2012).

El valor del coeficiente de correlación cofenética obtenido (0,92) en el análisis de agrupamiento, demuestra buena correspondencia entre el modelo propuesto y los datos analizados (Pardo *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010).

El análisis de coordenadas principales (CP) concordó con el análisis de agrupamiento UPGMA, pues separó los genotipos de *R. glaucus* (4, 8) provenientes del estado Aragua, del resto de los genotipos, así como también separó al genotipo *R. idaeus* (9) de los otros genotipos estudiados. En la Figura 3 se aprecia que el CP1 separó claramente los genotipos 1, 2 y 3 de los genotipos 4 y 8, explicando el 30,9% de la variabilidad y sugiriendo que la misma se debe a la ubicación geográfica; mientras que el CP2 explicó el 23,3% de la variabilidad debido al genotipo, pues se aprecia como separa claramente la frambuesa (genotipo 9)

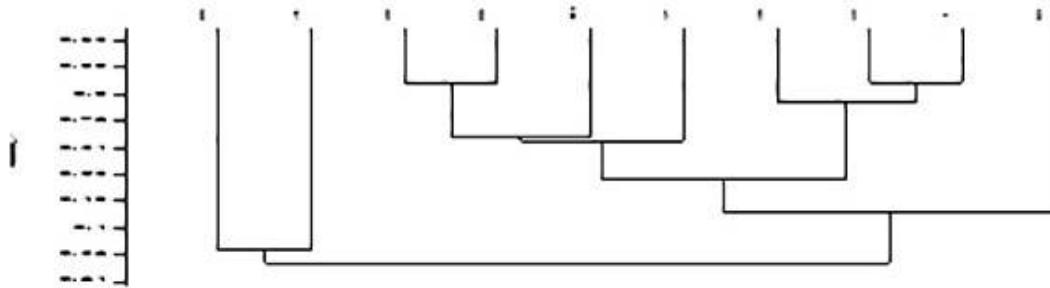


Figura 2. Dendrograma RAPD obtenido del análisis de agrupamiento UPGMA basado en el coeficiente de DICE para los 10 genotipos de *Rubus* estudiados.

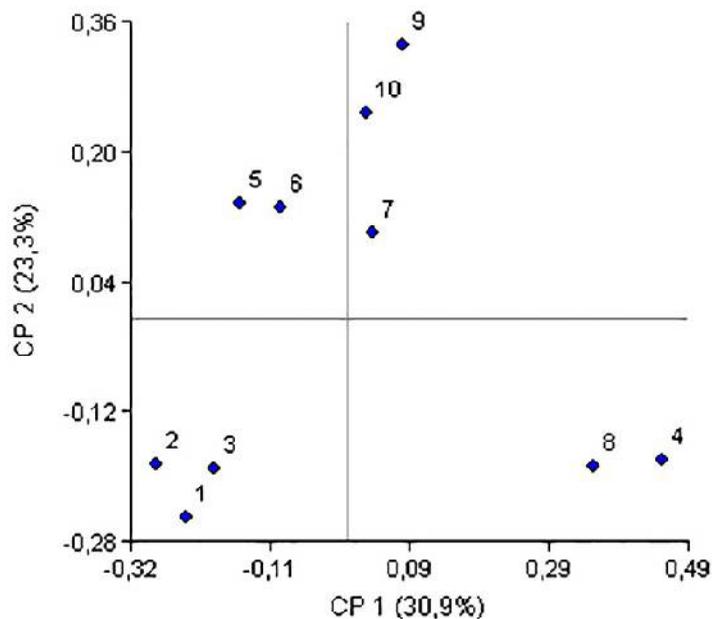


Figura 3. Análisis de coordenadas principales, utilizando el coeficiente de similitud de DICE, para los 10 genotipos de *Rubus* analizados.

de los otros materiales, mientras que el resto de los genotipos se ubicaron en posiciones intermedias. Con este análisis se explica el 54,2% de la variabilidad total.

CONCLUSIONES

La técnica PCR utilizando los seis marcadores RAPD que resultaron polimórficos, permitió detectar la variabilidad genética de las especies evaluadas, procedentes de dos estados de

Venezuela. El marcador OPW06 tuvo el más alto valor de PIC, por lo que resultó ser el más informativo.

Tanto el análisis de agrupamiento como el de coordenadas principales permitieron la separación de la especie silvestre *R. idaeus* de las otras especies analizadas, así como separar los genotipos por su procedencia geográfica, ya que los genotipos de *R. glaucus* procedentes del estado Aragua formaron un grupo separado del colectado en el estado Táchira.

El conocimiento de las relaciones genéticas entre las especies de *Rubus* procedentes de los estados Táchira y Aragua, permitirán planificar estrategias de colecta en programas de conservación de germoplasma y cruzamientos más eficientes entre estos materiales, dependiendo de los objetivos de un programa de mejoramiento genético que pudiera incluir cruzamientos interespecíficos.

LITERATURA CITADA

- Antonius, K. and H. Nybom. 1995. Discrimination between sexual recombination and apomixis/automixis in a *Rubus* plant breeding programme. *Hereditas*. 123:205-213.
- Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 17(2):221-242.
- Badjakov, I., E. Todorovska, V. Kondakova, R. Boicheva and A. Atanassov. 2006. Assessment the genetic diversity of bulgarian raspberry germplasm collection by Microsatellite and RAPD markers. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 14(suppl. 1):61-76.
- Bushakra, J., M. Stephens, A. Atmadjaja, K. Lewers, V. Symonds, J. Udall, D. Chagne, E. Buck and S. Gardiner. 2012. Construction of black (*Rubus occidentalis*) and red (*R. idaeus*) raspberry linkage maps and their comparison to the genomes of strawberry, apple, and peach. *Theoretical and Applied Genetics*. 125:311-327.
- Fernández, H., E. Soto, E. Salazar y M. Betancourt. 2010. Análisis RAPD entre y dentro de poblaciones derivadas de girasol silvestre x cultivado. *Agronomía Tropical*. 60(3):263-269.
- Gee-Suck, E., Ch. Byung-Yeoup, R. Bandopadhyay, Y. Nam-Hee, Ch. Dong-Geun and Y. Song Joong. 2011. Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 11(1):39-44.
- Graham, J. and R. McNicol. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics*. 90:1128-1132.
- Gutiérrez, M., y C. Rincón. 2011. Caracterización de la variabilidad genética mediante el uso de marcadores RAPDs, de un grupo de genotipos nativos y comerciales de caraota en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 61(1):73-83.
- Hammer, Ø., D. Harper and P. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1):9. Available online: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. [Jul. 20, 2013].
- Han-Wu, Z., W. Xiao-Rong, Z. Bi-Feng, X. Wu-Feng, L. Yuan, and Ch. Qing. 2009. Genetic relationships among 17 bramble cultivars and 11 wild excellent *Rubus* germplasms from China revealed by RAPD. *Agricultural Journal*. 4:179-183.
- Harshman, J. 2012. Evaluation of raspberry (*Rubus* sp.) genotypes for postharvest quality and resistance to *Botrytis cinerea*. Tesis Masters of Science. University of Maryland. Oregon, USA. 76 p. Available online: http://drum.lib.umd.edu/bitstream/1903/12834/1/Harshman_umd_0117N_13261.pdf. [Ago. 08, 2013].
- InfoStat. 2011. InfoStat versión 2.15 Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Laurentin, H. 2009. Data analysis for characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56:277-292.
- Lee, J., M. Dossett and Ch. Finn. 2012. *Rubus* fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*. 130:785-796.
- Marulanda, M. y M. Márquez. 2001. Caracterización de la diversidad genética de *Rubus glaucus* Benth con marcadores

- moleculares (RAPD). *Actualidades Biológicas*. 23(74):57-63.
- Marulanda, M. y M. Márquez. 2002. Evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus* mediante marcadores moleculares (RAPD). *Actualidades Biológicas*. 24(76):31-36.
- Marulanda, M., A. López and S. Aguilar. 2007. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 7:242-252.
- Moore, P. and D. Trople. 1999. Crossability of *Rubus* species with red raspberry in the wsu breeding program. *Acta Horticulturae (International Society for Horticultural Science)*. 505:357-362. Available online: http://www.actahort.org/books/505/505_48.htm. [Jul. 07, 2013].
- Pardo, A., A. Hernández y N. Méndez. 2009. Caracterización molecular de siete clones de ajo (*Allium sativum* L.) mediante la técnica RAPD. *Bioagro*. 21(2):81-86.
- Patamsytė, J., D. Zvingila, J. Labokas, V. Baliuckas, L. Balčiūnienė, V. Kleizaitė and V. Rančelis. 2008. Study of genetic diversity in wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) germplasm collection using morphological characters and RAPD markers. *Biologija*. 54(2):66-74.
- Patamsytė, J., D. Zvingila, V. Mažonytė, V. Kleizaitė, L. Baliucka, V. Balčiūnienė and V. Rančelis. 2005. Assessment of ecological impact on genetic diversity among populations of *Rubus idaeus* L. *Biologija*. 4:24-28.
- Pérez-Almeida, I., S. Vázquez, D. Pérez, y E. Salazar. 2010. Diversidad genética en seis especies de *Passiflora* spp. utilizando RAPD. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia (LUZ)*. 27:347-359.
- Roa, S. 2014. Variabilidad genética en mora (*Rubus* spp.) presente en los estados Táchira, Mérida y Aragua y su conservación *in vitro*. Tesis doctoral. Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT). Maracay, Venezuela. 103 p.
- Rohlf, F. J. and R. R. Sokal. 1981. Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Biology*. 30:459-490.
- Roldán-Ruiz, I., E. Dendauw, A. Van Bocktaele, A. Depicke and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*. 6:125-134.
- Salazar, B., H. Laurentín, M. Dávila and M. Castillo. 2006. Reliability of the RAPD technique for germplasm analysis of sesame (*Sesamun indicum* L.) from Venezuela. *Interciencia*. 31(6):456-450.
- Sneath, P. H. A. and R. R Sokal. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman. 573 p.
- Stafne, E., J. Clark, C. Matthew, M. Pelto and J. Lindstrom. 2003. Discrimination of *Rubus* cultivars using RAPD markers and pedigree analysis. *Acta Horticulturae (International Society for Horticultural Science)*. 626:119-124. *Proc. XXVI IHC – Berry Crop Breeding* Eds. P. Hicklenton and J. Maas.

Caracterización morfoagronómica de variedades de papas nativas y de uso local colectadas en el estado Mérida, Venezuela

Morpho-agronomic characterization of native and local potato varieties collected in Mérida state, Venezuela

Lourdes González Pérez^{1*}, Martha Osorio Delgado² y Franklin Suarez¹

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (¹INIA-Mérida e ²INIA-CENIAP). *Correo electrónico: lcgonzalez@inia.gob.ve

RESUMEN

En las zonas altas andinas, es donde básicamente se conserva amplia diversidad de especies y cultivares de papas nativas (*Solanum tuberosum* L.). En Mérida existen variedades cultivadas que datan desde hace 30 años; sin embargo, el conocimiento sobre este valioso germoplasma es escaso. Por ello, se han realizado colectas de variedades nativas con el fin de caracterizarlas para aumentar el conocimiento sobre su diversidad genética y su calidad para consumo fresco o procesado. El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización morfoagronómica de variedades de papas nativas y de uso local, colectadas en comunidades campesinas de los municipios Rangel, Pueblo Llano, Cardenal Quintero, Miranda, Libertador, Campo Elías y Arzobispo Chacón del estado Mérida. Se evaluaron 34 variedades nativas, sembradas durante cuatro ciclos a 3100 m.s.n.m., tomando en cuenta caracteres cualitativos, cuantitativos y nutricionales, además de la calidad para fritura. Las papas nativas y de uso local evaluadas presentaron gran diversidad de formas y colores, así como grandes diferencias en rendimiento. Las pruebas de frituras indicaron que estas variedades no son aptas para la industria. El contenido nutricional alcanzado fue menor al señalado en variedades nativas de países de la región andina y por debajo del requerido en la alimentación humana. No obstante, constituyen un material genético a considerar en los programas de mejoramiento, dado sus atributos de resistencia a factores bióticos y abióticos. Su valorización y conservación dependerá de la información generada.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., caracteres cualitativos, caracteres cuantitativos, nutrición, germoplasma.

ABSTRACT

In the highlands of the Andes is where basically a wide diversity of species and cultivars of native potatoes (*Solanum tuberosum* L.) has been conserved. In Merida, varieties have been in used for more than 30 years, however, information about this valuable germplasm is very limited, for this reason, native varieties have been collected and characterized to increase knowledge about their genetic diversity and quality for fresh or processing consumption. The aim of the study was to perform morpho-agronomic characterization of native and local potato varieties collected in rural communities of Municipalities Rangel, Pueblo Llano, Cardenal Quintero, Miranda, Libertador, Campo Elías and Arzobispo Chacon in Merida state. 34 landraces were evaluated, grown for four cycles at 3,100 m of altitude. Qualitative, quantitative, nutritional and frying quality traits were considered. The results showed that native and local potatoes showed great diversity of shapes and colors as well as large differences in yields. Fry tests indicated that, in planting conditions and agronomic management used, these varieties are not suitable for the industry. The nutritional content achieved was lower than reported in native varieties of Andean region, and below the required for the human diet. However they constitute a genetic pool to consider in breeding programs, due to the resistance to biotic and abiotic factors, and its valorization and conservation will depend of the outcome of this study.

Key words: *Solanum tuberosum* L., qualitative traits, quantitative traits, nutrition, germplasm.

Recibido: 11/02/14

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es un rubro alimenticio originario de las culturas pre-incas e incas. En la actualidad es consumido en casi todos los pueblos del mundo; y aunado a los cereales (trigo, maíz y arroz) constituye uno de los cuatro cultivos de importancia en la alimentación humana (Cuesta *et al.*, 2002; Ezeta, 2002). Además, es un componente fundamental en la dieta, por su alto contenido de carbohidratos, vitaminas y minerales, especialmente en las zonas andinas (Egusquiza, 2000; Secor y Rivera-Varas, 2004).

En el mundo se cultivan 5000 variedades de papa y la mayor variabilidad genética de especies se concentra en el área de la meseta peruano-boliviana. Actualmente, la papa se clasifica en variedades nativas y modernas; en blancas y de color; y amargas, amarillas e industriales (Gabriel, 2010).

Las papas nativas son cultivadas mayormente en las zonas alto andinas, donde se conserva a través de los siglos una amplia diversidad de especies y cultivares (Huamán *et al.*, 2010). En esta región, los cultivares nativos han sido usados por los agricultores principalmente como base de la seguridad alimentaria y por los fitomejoradores para el mejoramiento genético del cultivo (Moreno y Valbuena, 2006).

En las comunidades del estado Mérida, Venezuela, los agricultores conservan en sus unidades de producción variedades que datan desde hace más de 30 años, las cuales se cultivan entre 2500 y 4000 m.s.n.m., de manera orgánica, es decir, con un reducido uso de agroquímicos; por lo general, este rubro es plantado como mezcla de variedades en un solo campo (García y Salas, 2005).

La comercialización de estas papas es baja, en relación a la papa blanca. Sin embargo, en los últimos años ha incrementado su distribución, debido a que existen algunos compradores mayoristas que la transportan a otros estados o mercados cercanos.

En el país, no existe información documentada acerca de este valioso germoplasma, por esto, desde hace más de 10 años se han realizado colectas con el fin de describirlas.

La caracterización de las papas nativas ayuda a ampliar el conocimiento sobre su diversidad, sus atributos de resistencia a factores bióticos y abióticos, así como la calidad para el consumo fresco o procesado (Huamán *et al.*, 2010). Asimismo, constituye la base para los programas de mejoramiento, permitiendo hacer uso eficiente del potencial genético de estas variedades (Moreno y Valbuena, 2006).

El presente trabajo se realizó con la finalidad de caracterizar morfoagronómicamente variedades de papas nativas y de uso local, provenientes de las comunidades campesinas de los municipios Rangel, Pueblo Llano, Cardenal Quintero, Miranda, Libertador, Campo Elías y Arzobispo Chacón del estado Mérida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 34 variedades de papas nativas provenientes de las comunidades campesinas de los municipios Rangel, Pueblo Llano, Cardenal Quintero, Miranda, Libertador, Campo Elías y Arzobispo Chacón del estado Mérida. Las papas colectadas se sembraron durante 4 años en el Campo Experimental Mucuchíes "Dr. Eduardo Ortega Cartaya" del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Mérida), ubicado a 3100 m.s.n.m. (08°45'86" N y 070°53'09" W), con el fin de realizar la caracterización *ex situ*.

Se sembraron 15 plantas/variedad en un área de dos parcelas divididas en 17 surcos de 6 m de largo, a una distancia de 0,90 m entre surcos y 0,40 m entre plantas. En la siembra se aplicó fertilizante granulado 12-12-17/2 en dosis de 1000 kg ha⁻¹, y antes del aporque se realizó la aplicación de sulfato de potasio y nitrato de calcio, en dosis de 250 kg ha⁻¹.

Para la caracterización de la morfología de la planta, la flor y el tubérculo se utilizaron los descriptores del Centro Internacional de la Papa (Huamán y Gómez, 1994). Estos valores cualitativos se expresaron en porcentajes según lo señalado por Castillo *et al.* (2007a).

Se evaluó el porcentaje de emergencia y se seleccionaron cinco plantas por hilo para la evaluación de los caracteres cualitativos: hábito de crecimiento, color del tallo, color primario de la flor, color secundario de la flor, distribución del

color secundario de la flor, forma del tubérculo, color primario del tubérculo, color secundario del tubérculo, distribución del color secundario del tubérculo, color primario de la carne del tubérculo, color secundario de la carne, distribución del color secundario de la carne del tubérculo y profundidad de ojos.

Dentro de los caracteres cuantitativos se evaluaron: rendimiento ($t\ ha^{-1}$), altura de la planta (cm) y número de tallos/planta en $1\ m^2$. Además, se valoró la calidad de fritura realizada por la empresa Snacks América Latina (PepsiCo Alimentos S.C.A.) planta La Grita, estado Táchira. Asimismo, se determinó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro Nacional Investigaciones Agropecuarias, adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), Maracay, el contenido de macronutrientes expresado en base seca (% de materia seca a $60\ ^\circ C$, % humedad a $105\ ^\circ C$, % ceniza, % proteína cruda, % Nitrógeno, % fibra cruda y % grasa cruda) de las variedades que para el momento del análisis bromatológico contaban con la cantidad adecuada de tubérculos. A estos valores se le estimaron los estadígrafos fundamentales: media, valores máximos y valores mínimos (Castillo *et al.*, 2007 b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracteres cuantitativos

En el Cuadro 1 se presentan los valores de rendimiento comercial. Este carácter fue muy variable, encontrándose una alta diferencia entre los valores máximos y mínimos. El mayor valor lo alcanzaron las variedades Concha gruesa del productor Pablo Quintero y Arbolona negra del agricultor Antonio García con $55\ t\ ha^{-1}$ cada una, mientras que el valor más bajo se detectó en la variedad Tocana, producida por Bernavé Torres, con $10\ t\ ha^{-1}$. Estas diferencias observadas son atribuibles a la condición genética *per sé* de cada material evaluado, ya que a todos se les realizó el mismo manejo agronómico.

La altura de planta no mostró grandes diferencias, variando entre los 61 y 127 cm; mientras que el número de tallos/planta varió de 3 a 6 (Cuadro 2).

En relación a la caracterización del contenido nutricional (Cuadro 3), se encontró que la cantidad de proteínas alcanzada en 15

variedades fue de aproximadamente 7,30% siendo este valor menor que el encontrado por Montero *et al.* (2010) en variedades de papas nativas de Ecuador, que en promedio obtuvieron 8% de proteína. Estos autores señalan que, en general, los niveles de proteína encontrados en las papas nativas son insuficientes para cubrir el requerimiento diario, por lo que su ingesta debe acompañarse de otros vegetales o alimentos que suplementen los nutrientes faltantes en este tubérculo, con el objeto de lograr una nutrición equilibrada.

La materia seca (MS) fue en promedio 24,36%, lo cual está dentro del rango considerado para la papa (entre 13 a 35%). Se determinó que el contenido de MS está influenciado por factores climáticos como tipo de suelo, fertilización, riego, temperaturas diurnas y nocturnas en estado de maduración, entre otros (Gabriel, 2010).

El promedio de fibra cruda fue de 1,79% y aunque la fibra no es un nutriente en sentido estricto, es considerada como un componente funcional, porque es indispensable para el buen funcionamiento del organismo humano. El contenido promedio de grasa fue de 0,10%, el cual fue menor a los valores de grasas encontrados por Monteros y Pallo (2009), en evaluación de papas nativas de Ecuador.

Las papas nativas no sólo tienen formas y colores vistosos, sino que también aportan cantidades importantes de nutrientes y compuestos funcionales, que mejoran una o más funciones del organismo, más allá del efecto nutricional adecuado (Castillo *et al.*, 2007b; Montero *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en las pruebas de calidad de fritura, mostraron que ninguna de las variedades evaluadas fue apta ya que el porcentaje de defectos totales estuvo por encima de 15%, que es el valor máximo aceptado (Cuadro 4). Los componentes más significativos para la industria de procesamiento son los contenidos de almidón y MS.

Otros componentes que influyen directamente en la calidad y selección de variedades para los procesos de fritura son los azúcares, especialmente glucosa, fructosa y sacarosa, que se encuentran en mayor cantidad en la carne del tubérculo (Moreno, 2000; Oviedo-Chávez, 2005).

Cuadro 1. Rendimiento promedio en t ha⁻¹ de 34 variedades de papas nativas y de uso local colectadas en el estado Mérida.

Variedad	Productor	Localidad	Municipio	Rendimiento t ha ⁻¹
Papa negra	Carmen Santiago	Chinó Alto	Pueblo Llano	19
Papa negra	Ramón Hernadez	Las Piñuelas	Rangel	38
Papa negra	Rosario Santiago	Motus Bajo	Pueblo Llano	26
Papa negra	Atilio González		Pueblo Llano	26
Papa negra	Víctor Dionel Santiago	Chinó Alto	Pueblo LLano	14,81
Papa negra	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	26
Papa negra	Jesús Anibal Santiago	Chinó Alto	Pueblo LLano	13
Arbolona negra	Atilio González		Pueblo Llano	28
Concha gruesa	Pablo E. Quintero	Los Conejos	Campo Elías	55
Arbolona negra	Antonio García	Los Pantanos	Pueblo Llano	55
Arbolona negra	Carmen Santiago	Chinó Alto	Pueblo Llano	30
Arbolona negra	Bernave Torres	Gavidia	Rangel	30,5
Arbolona negra	Emelia Santiago	Los Pantanos	Pueblo Llano	38
Arbolona negra	Ramón Castellano	Tafayes	Miranda	21
Arbolona negra	Los Trigales	Las Agujas	Pueblo Llano	38
Arbolona negra	Los Montesitos	Cañotal	Cardenal Quintero	38
Arbolona negra	José Lubín Santiago	Santo Domingo	Cardenal Quintero	12
Arbolona negra	Gilberto Paredes	El Hatico	Miranda	14,51
Arbolona negra Los Nevados	Paúl Sánchez/Juan Sánchez	Los Nevados	Libertador	17
Papa gata Los Nevados	Paúl Sánchez/Juan Sánchez	Los Nevados	Libertador	25,92
Arbolona negra Petacona	Idulfo Pérez	Las Mazorcas	Rangel	17,96
Tiniruca	Mario Hernández	Micarache	Rangel	17,28
Cucuba	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	12
Roja El Molino	Alonzo Contreras	El Molino	Arzobispo Chacón	16,66
Rosada	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	42
Vidrio rojo	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	13
Tocana	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	10
Roja	Camilo Garnica	El Molino	Arzobispo Chacón	19
Camilera	Idulfo Pérez	Las Mazorcas	Rangel	17
Tequendama	Adelaida Paredes	Piedra Blanca	Miranda	18,51
Reinosa	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	13,5
Revolución	Camilo Garnica (colector)	El Molino	Arzobispo Chacón	14
Guadalupe	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	16,11
Rojita piñango	Ángel Araujo	Las Tapias	Miranda	18,51
Media				23,86
Valor máximo				55
Valor Mínimo				10
DS				11,36
CV				47,61%

Análisis de varianza; DS=Desviación estándar; CV=Coefficiente de variación.

Cuadro 2. Altura (cm) y número de tallos por metro cuadrado (tallos/m²) de variedades de papas nativas y de uso local colectadas en el estado Mérida.

Variedad	Productor	Localidad	Municipio	Altura (cm)	Número de tallos/m²
Papa negra	Carmen Santiago	Chino Alto	Pueblo Llano	86	5
Papa negra	Ramón Hernández	Las Piñuelas	Rangel	72	3
Papa negra	Rosario Santiago	Motus Bajo	Pueblo Llano	69	5
Papa negra	Atilio González	Pueblo Llano	Pueblo Llano	108	4
Papa negra	Víctor D. Santiago	Chinó Alto	Pueblo LLano	68	5
Papa negra	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	38	3
Papa negra	Jesús A. Santiago	Chinó Alto	Pueblo LLano	87	6
Arbolona negra	Atilio González	Pueblo Llano	Pueblo Llano	127	6
Concha gruesa	Pablo E. Quintero	Los Conejos	Campo Elías	75	4
Arbolona negra	Antonio García	Los Pantanos	Pueblo Llano	76	6
Arbolona negra	Carmen Santiago	Chinó Alto	Pueblo Llano	91	6
Arbolona negra	Bernave Torres	Gavidia	Rangel	82	6
Arbolona negra	Emelia Santiago	Los Pantanos	Pueblo Llano	94	5
Arbolona negra	Ramón Castellano	Tafayes	Miranda	68	4
Arbolona negra	Los Trigales	Las Agujas	Pueblo Llano	61	4
Arbolona negra	Los Montecitos	Cañotal	Cardenal Quintero	109	5
Arbolona negra	José Lubín Santiago	Santo Domingo	Cardenal Quintero	67	6
Arbolona negra Los Nevados	Paúl Sánchez y Juan Sánchez	Los Nevados	Libertador	70	4
Cucuba	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	75	4
Roja El Molino	Alonzo Contreras	El Molino	Arzobispo Chacón	62	3
Rosada	Bernavé Torres	Gavidia	Rangel	68	4
Tequendama	Adelaida Paredes	Piedra Blanca	Miranda	66	4

Cuadro 3. Características nutricionales de variedades de papas nativas y de uso local colectadas en localidades del estado Mérida.

Parámetros	Valor máximo	Valor mínimo	Promedio
% de materia seca a 60° C	28,8	17,34	24,36
% Humedad a 105° C	5,68	3,62	4,65
% Ceniza	6,29	1,07	4,38
% Proteína cruda	9,27	5,01	7,23
% Nitrógeno	1,43	0,8	1,15
% Fibra cruda	2,69	1,01	1,79
% Grasa Cruda	0,21	0,007	0,10

Cuadro 4. Análisis realizado por la Empresa procesadora Snacks América Latina (PepsiCo Alimentos S.C.A.) planta La Grita, estado Táchira.

Nombre del Cultivar	Procedencia	Productor	Color				Defectos totales (%)
			indeseable (%)	Verde (%)	Decoloración interna (%)	Decoloración externa (%)	
Papa negra	Pueblo Llano	Atilio González	12,76	6,03	30,15	0,00	48,94
Papa negra	Chinó Alto-Pueblo Llano	Jesús Aníbal Santiago	100	0,00	0,00	0,00	100
Arbolona negra	Pueblo Llano	Atilio González	16,72	0,00	27,4	6,36	50,48
Arbolona negra	Chinó Alto-Pueblo Llano	Carmen Santiago	67,88	13,94	0,00	0,00	81,82
Arbolona negra	Gavidia (Rangel)	Bernavé Torres	31,15	17,13	21,14	0,00	69,42
Rosada	Gavidia (Rangel)	Bernavé Torres	100	0,00	0,00	0,00	100
Vidrio rojo	Gavidia-(Rangel)	Bernavé Torres	100	0,00	0,00	0,00	100
Camilera	Mazorcas-Gavidia (Rangel)	Idulfo Pérez	100	0,00	0,00	0,00	100
Revolución	El Molino	Camilo Garnica (colector)	100	0,00	0,00	0,00	100
Guadalupe	Gavidia-Rangel	Bernavé Torres	26,17	0,00	40,78	0,00	66,95

En la Figura 1 se muestra la distribución de las papas nativas y de uso local de acuerdo a la altura donde se colectaron, se observó que el mayor número de muestras se ubicaron en alturas mayores a 3000 m.s.n.m., esto coincide con lo señalado por Monteros y Pallo (2009), quienes indican que las papas nativas se producen en alturas superiores a los 3000 m.s.n.m.

Caracteres cualitativos

Las papas nativas y de uso local presentaron diversidad de formas, colores de piel y pulpa de tubérculo, así como variación en flores y otros caracteres morfológicos. En la Figura 2 y hasta la Figura 15, se presentan los porcentajes de comportamiento de hábito de crecimiento, color del tallo, color primario de la flor, color secundario de la flor, distribución del color secundario de la flor, grado de floración, forma del tubérculo, color primario del tubérculo, color secundario del tubérculo, distribución del color secundario del tubérculo, color primario de la carne del tubérculo, color secundario de la carne, distribución del color secundario de la carne del tubérculo y profundidad de ojos para las 34 variedades estudiadas. Los caracteres donde se observó mayor variación fueron el color primario de la piel del tubérculo (Figura 9), color secundario de la piel del tubérculo (Figura 10) y color primario de la flor (Figura 4).

El hábito de crecimiento fue mayormente erecto en 76,47% de las variedades evaluadas (Figura 2). El color del tallo mostró siete colores diferentes, predominando el verde con pocas manchas (38,23%), seguido del verde con muchas manchas con un 26,47% (Figura 3). En cuanto al color primario de la flor, predominó el morado oscuro en un 52,94% (Figura 4), mientras que el color secundario estuvo ausente en un 55,88% de las variedades evaluadas (Figura 5). La distribución del color secundario de la flor predominante fue la presente en el acumen con un 35,29% (Figura 6). Predominó el grado de floración moderado en una proporción de 55,88% (Figura 7).

En la Figura 8 se presentan los porcentajes para la forma del tubérculo, donde la forma comprimida fue la que más predominó con un 55,88%, seguida de la forma redonda. En cuanto al color primario de la piel; predominó el morado intermedio (32,35%), siendo este el carácter de mayor variación con 13 colores diferentes (Figura 9). En lo que respecta al color primario de la carne, se observaron cinco colores donde el mayor valor fue el alcanzado por el blanco con 38,25%, seguido del crema con un 26,47% (Figura 12). En la mayoría de las variedades evaluadas (82,35%) no se observó pigmentos en la carne (Figura 13).

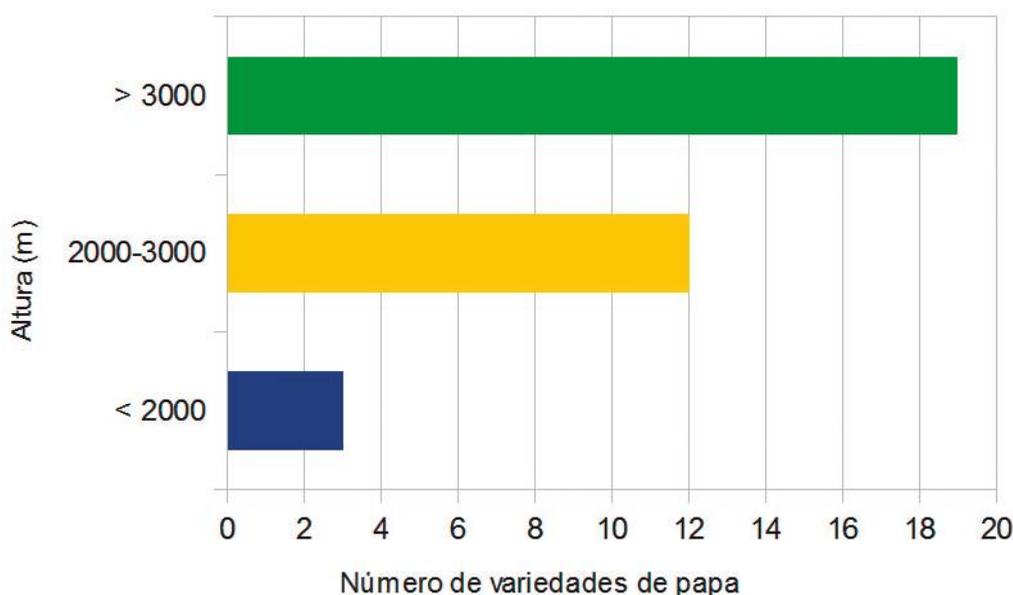


Figura 1. Distribución de las variedades de papas nativas y de uso local de acuerdo a la altura.

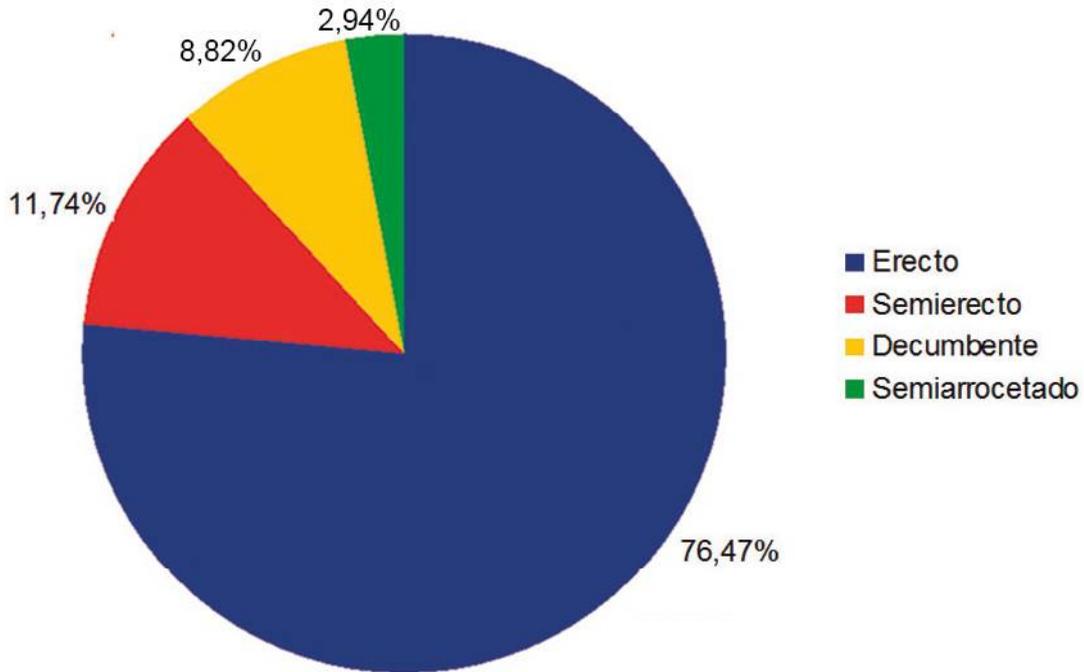


Figura 2. Hábito de crecimiento de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

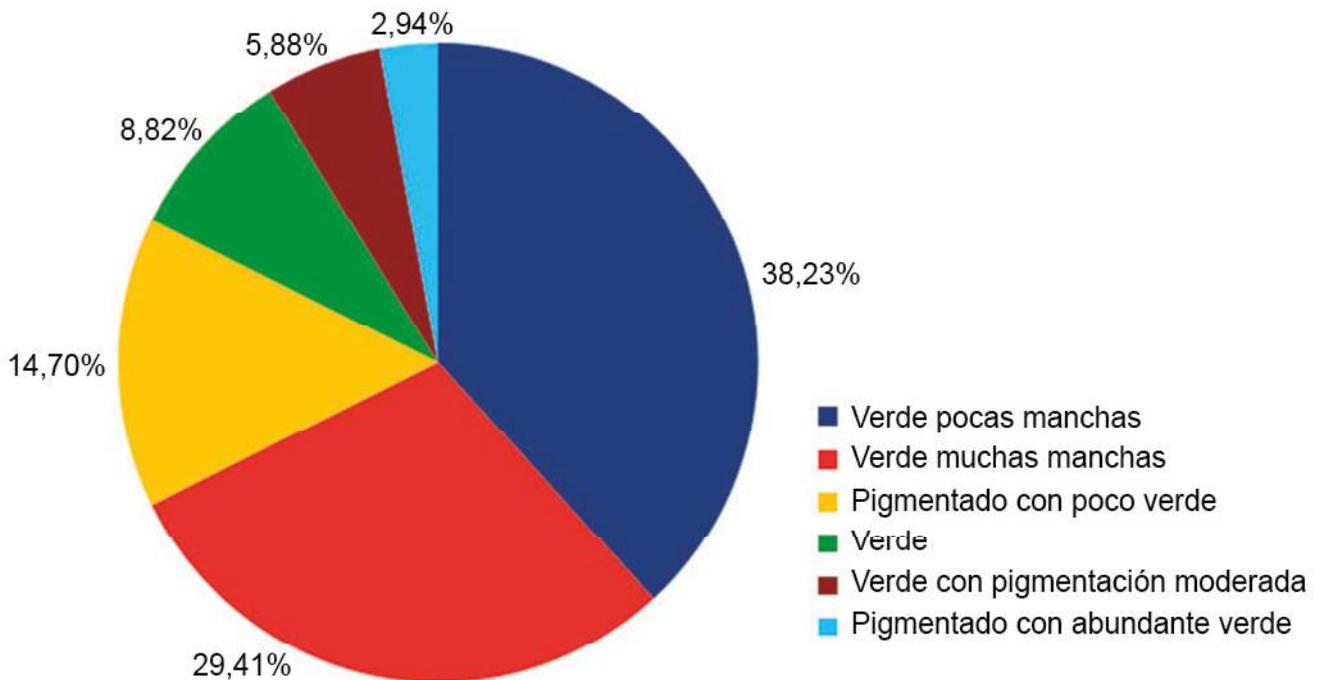


Figura 3. Color del tallo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

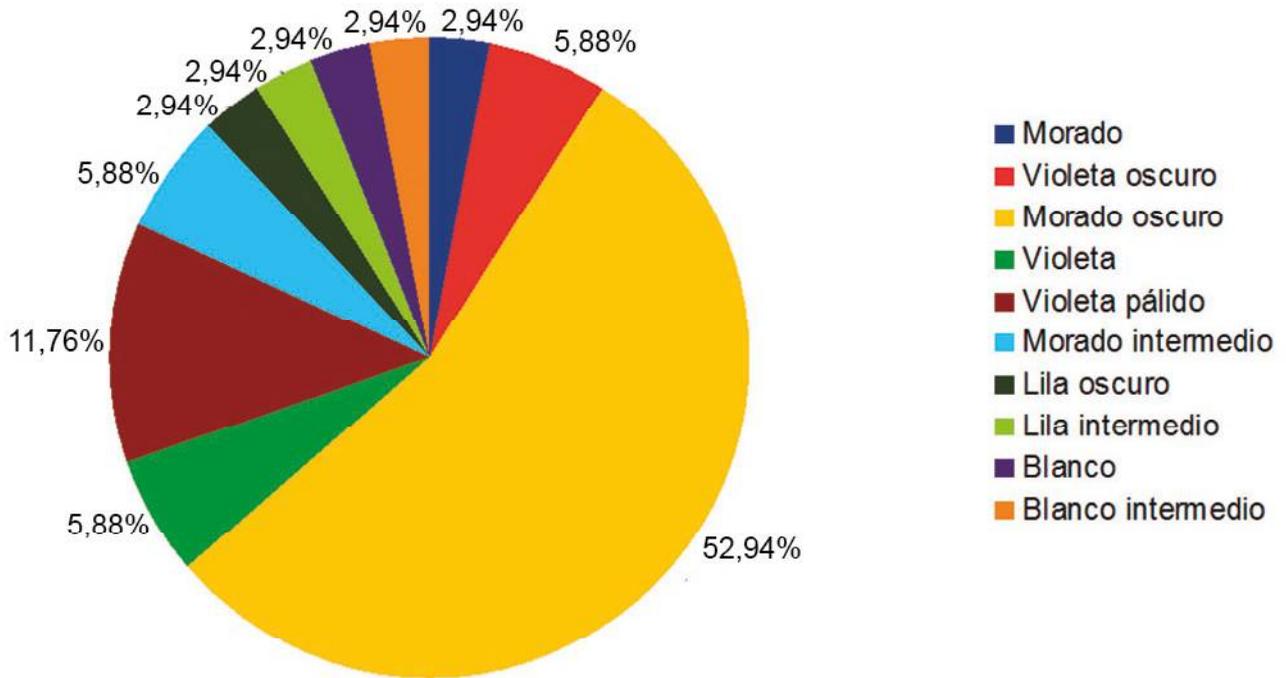


Figura 4. Color primario de la flor de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

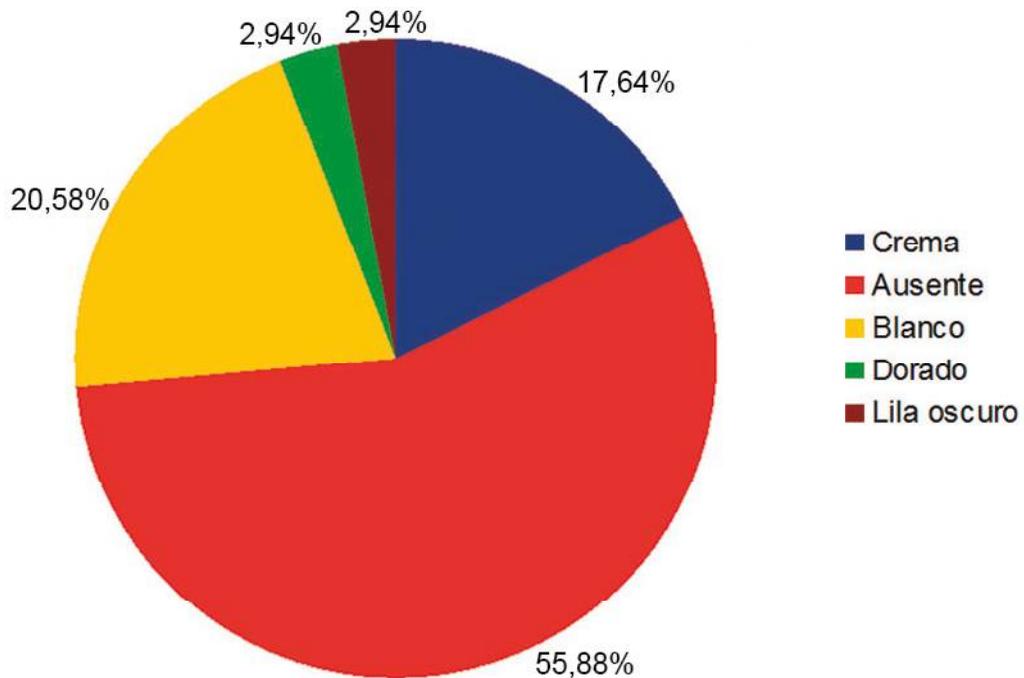


Figura 5. Color secundario de la flor de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

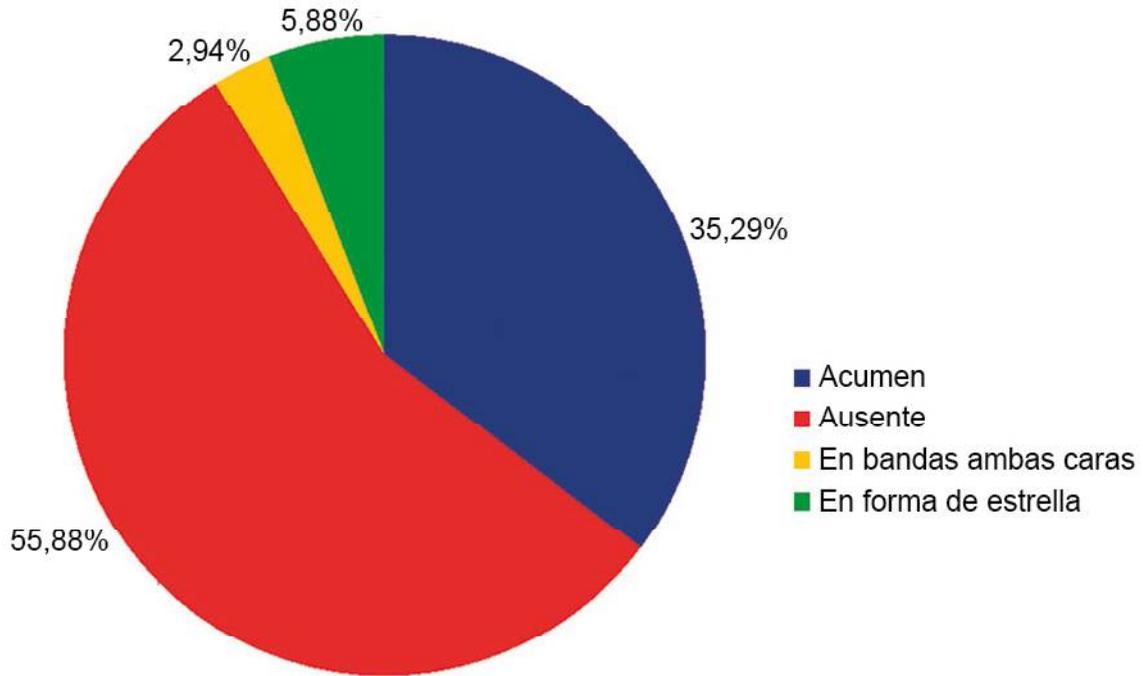


Figura 6. Distribución del color secundario de la flor de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

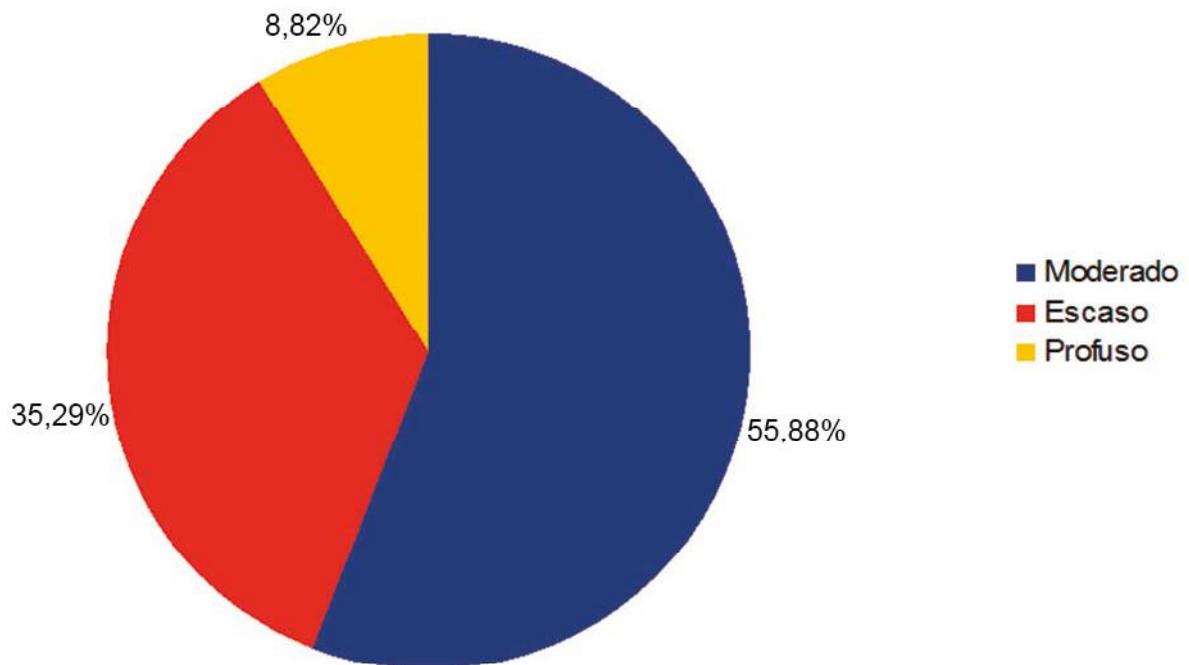


Figura 7. Grado de floración de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

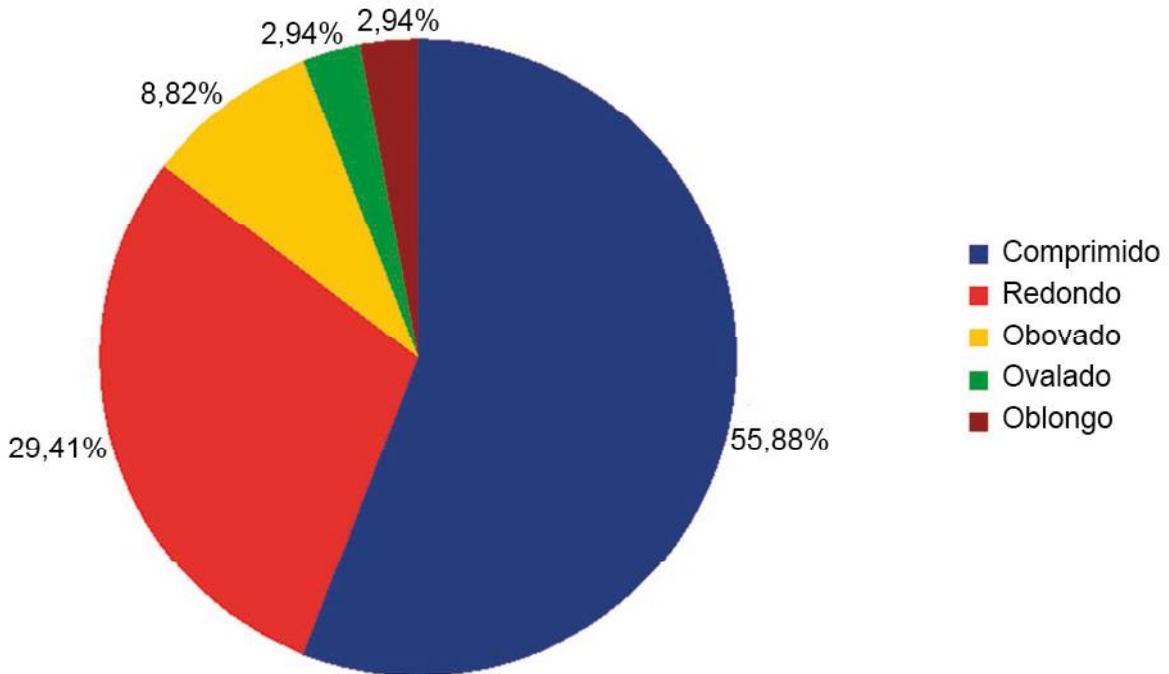


Figura 8. Forma del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

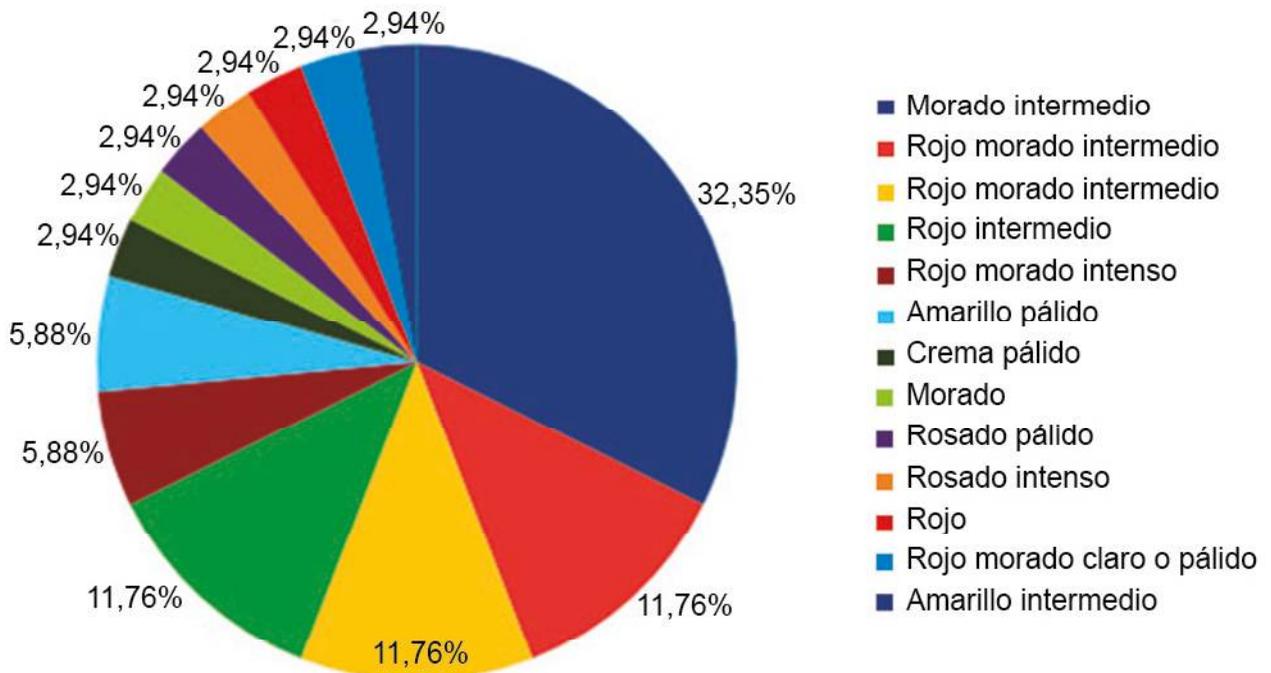


Figura 9. Color primario de la piel del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

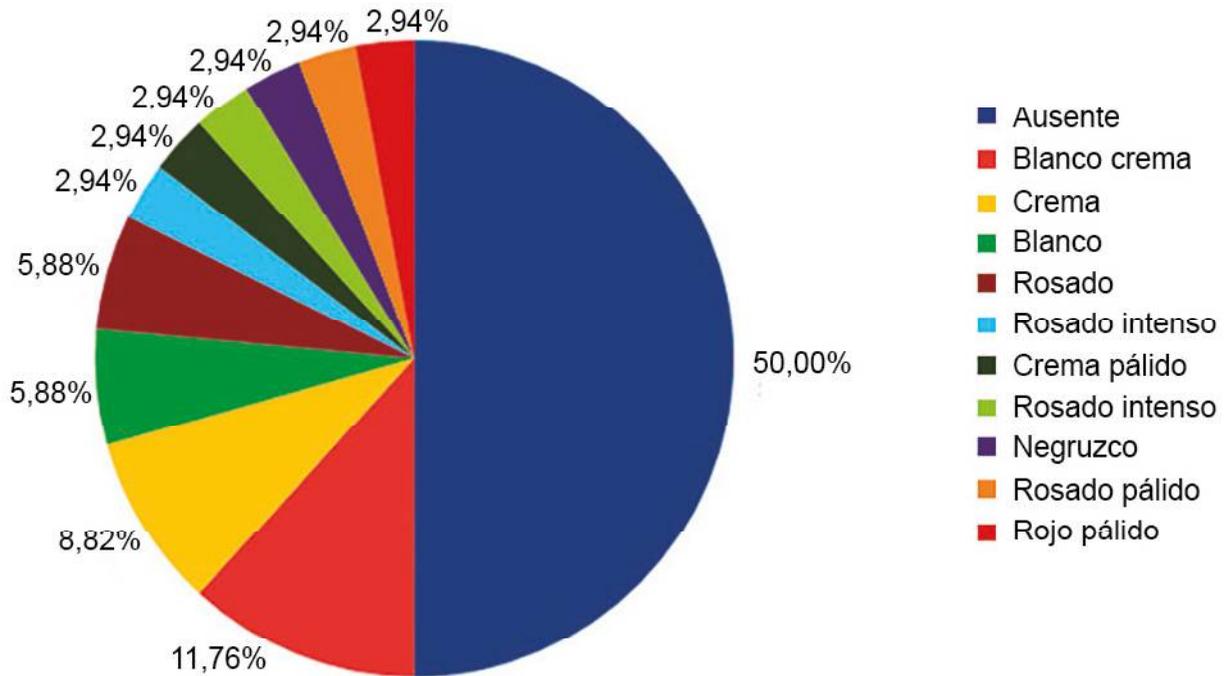


Figura 10. Color secundario de la piel del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

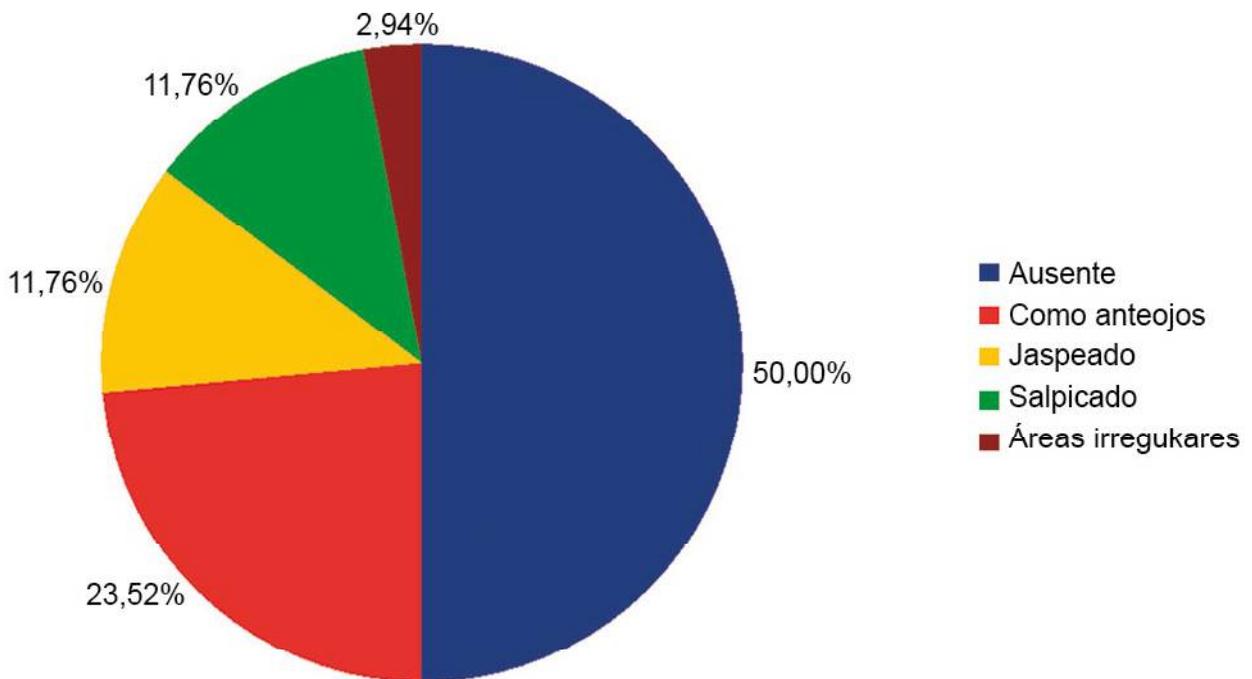


Figura 11. Distribución del color secundario de la piel del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

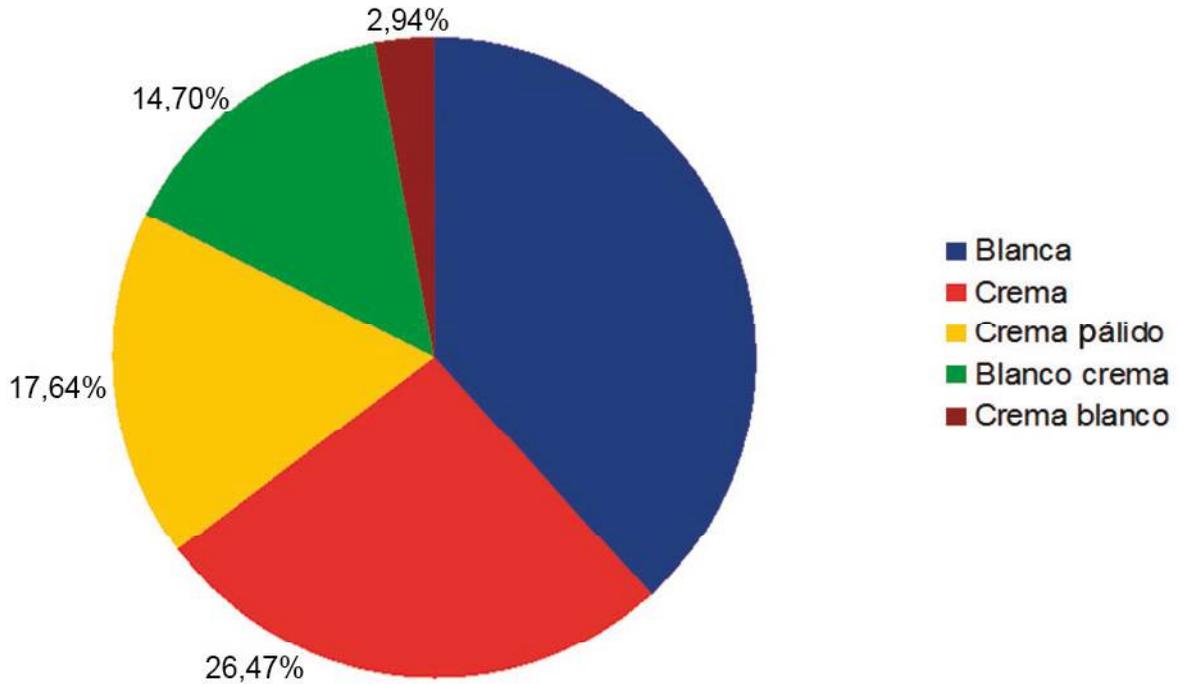


Figura 12. Color primario de la carne del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

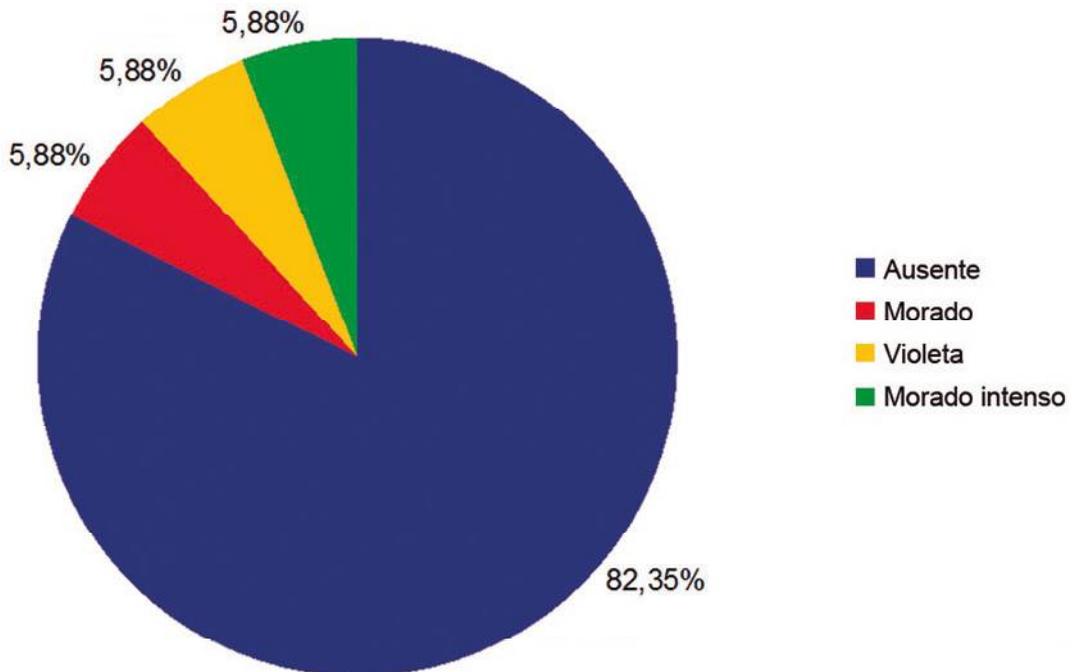


Figura 13. Color secundario de la carne del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

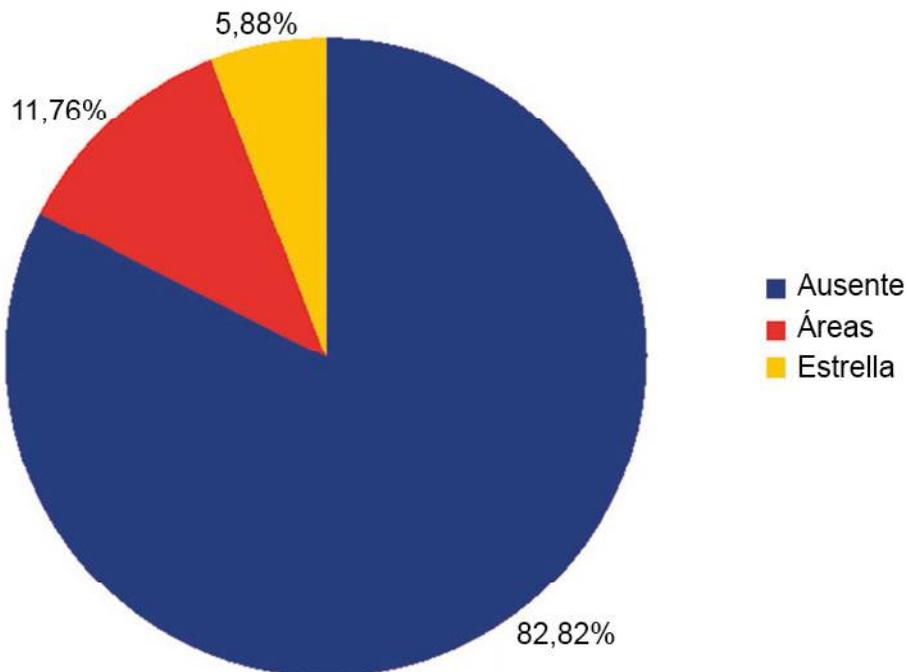


Figura 14. Distribución del color secundario de la carne del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

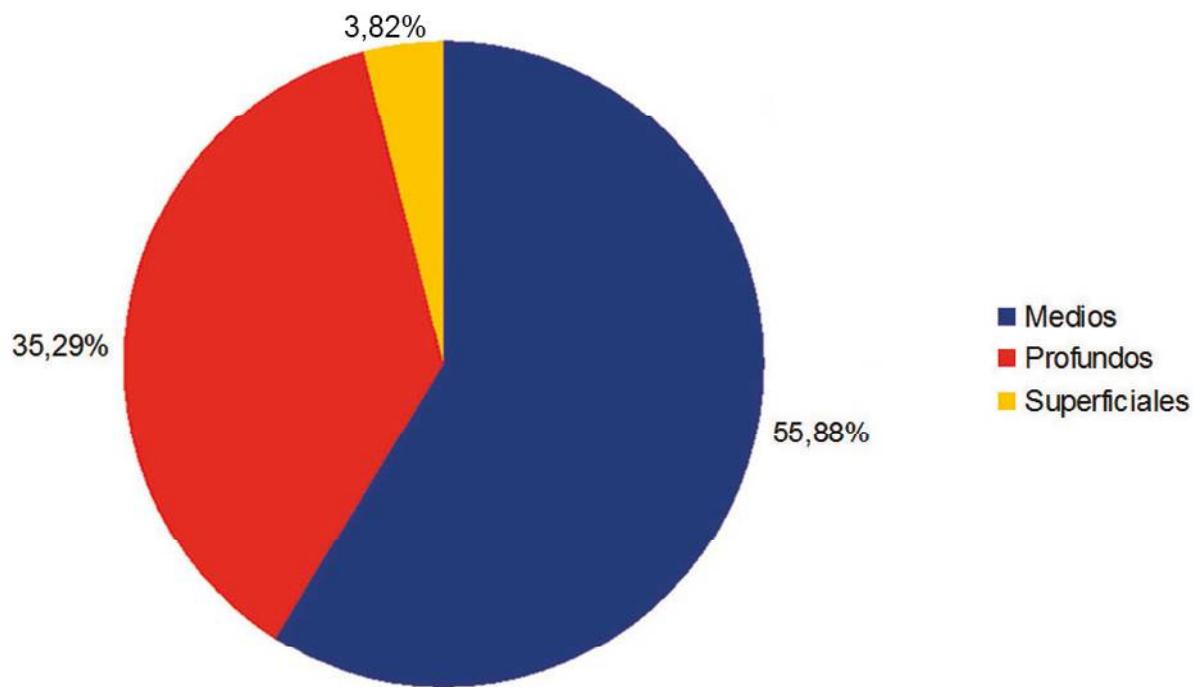


Figura 15. Profundidad de ojos del tubérculo de 34 variedades de papa nativa y de uso local, colectadas en comunidades del estado Mérida.

En relación a la profundidad de los ojos, el mayor porcentaje se presentó en ojos medios (55,88%), seguidos de ojos profundos (35,29%) y el valor más bajo fue para los ojos superficiales con un 3,82% (Figura 15). Este carácter monogénico, por lo general, se incluye.

CONCLUSIÓN

La caracterización morfoagronómica permitió distinguir la gran diversidad de formas y colores existentes en las papas nativas y de uso local colectadas, así como las diferencias en los rendimientos registrados. Se identificó la gran riqueza genética presente en la región andina venezolana, específicamente en pisos altitudinales superiores a los 3000 m.s.n.m., diversidad que junto a los atributos de resistencia a factores bióticos y abióticos, aunada a la calidad para el consumo en fresco o procesado, puede ser aprovechada en los programas de mejoramiento genético del cultivo en el país.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento a la doctora Ariadne Vegas García, por los valiosos aportes al manuscrito y al Fondo Nacional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO), por el financiamiento otorgado a través del Proyecto 353-05 titulado: Innovaciones tecnológicas y mercados diferenciados para productores de papas nativas. Capítulo Venezuela.

LITERATURA CITADA

- Castillo, J., A. Estévez, J. Salomón, A. Pérez y U. Ortiz. 2007a. Caracterización morfoagronómica del germoplasma cubano de papa (*Solanum* ssp.). Evaluación de las especies silvestres. Parte I. Cultivos Tropicales. 28(1):63-68.
- Castillo, J., A. Estévez, J. Salomón, A. Pérez y U. Ortiz. 2007b. Caracterización morfoagronómica del germoplasma cubano de papa (*Solanum tuberosum* L.). Evaluación de las accesiones cultivadas. Parte II. Cultivos Tropicales. 28(4):69-73.
- Cuesta, X., H. Andrade, O. Bastidas, R. Quevedo y S. Sherwood. 2002. Botánica y mejoramiento genético. In: El cultivo de la papa en Ecuador. Manuel Pumisacho y Stephen Sherwood Editores. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - Centro Internacional de la Papa (INIAP-CIP). Quito, Ecuador. 124 p.
- Egusquiza, B. 2000. La papa: Producción, transformación y comercialización. Ediciones de la Universidad Nacional Agraria. La Molina, Perú. 192 p.
- Ezeta, F. 2002. La competitividad en el cultivo de papa en Latinoamérica y el Caribe: Implicaciones y retos inmediatos: Memorias del XX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa, Asociación Latinoamericana de Población (ALAP). Quito, Ecuador. 148 p.
- Gabriel, J. 2010. Estrategias y perspectivas del mejoramiento genético de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Bolivia. Samantha Cabrera y Andrea Alkeman Editores. Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA). Cochabamba, Bolivia. 60 p.
- García, R. y J. Salas. 2005. Aspectos generales del cultivo de la papa. In: Producción de semilla de papa en Venezuela. Series Manuales de Cultivo INIA N° 5. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Mérida, Venezuela. 288 p.
- Huamán, Z. y R. Gómez. 1994. Descriptores de la papa para la caracterización básica de colecciones nacionales. Ediciones del Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 10 p.
- Huamán, D., R. Gutiérrez, L. Lizárraga, C. De La Torre, C. Valencia y R. Schafleitner. 2010. Caracterización de papas nativas para la morfología y el procesamiento en la comunidad de Palccoyo. Memorias del XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP). Cuzco, Perú. 89 p.
- Montero, C., F. Yumisaca, J. Andrade-Piedra e I. Reinoso. 2010. Catálogo de papas nativas Sierra centro norte de Ecuador: Etnobotánico, morfológico, agronómico y calidad. Publicación Miscelánea 179 (Supl).

- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Ecuador. 80 p.
- Monteros, C. y E. Pallo. 2009. Conservación y revalorización de papas nativas con pequeños productores de la provincia Bolívar, Ecuador. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 15(1):78-85.
- Moreno, J. 2000. Calidad de la papa para usos industriales. *Revista Papas Colombianas*. pp. 44-47.
- Moreno, J. e I. Valbuena. 2006. Colección central colombiana de papa: Riqueza de variabilidad genética para el mejoramiento del cultivo. *Revista Innovación & Cambio Tecnológico*, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Bogotá, Colombia. 4(4):16-24.
- Oviedo-Chávez, A. 2005. Estudio de características físico-químicas de clones promisorios de papa. Tesis licenciatura en Química. Unión Nacional de Educadores (UNE). Quito, Ecuador. 110 p.
- Secor, G. and V. Rivera-Varas. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 10(1):1-8.