

Análisis de la variabilidad genética de la colección colombiana de musáceas usando marcadores isoenzimáticos

Analysis of the genetic variability of colombian collection of Musaceae using isozyme markers

Martha C. Giraldo^{1†}, Gustavo A. Ligarreto^{2*}, Gerardo Cayón^{2‡}, y Constanza Melo^{3††}

¹Department of Plant Pathology, Kansas State University, USA. ²Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. ³Departamento de Biología, Universidad Pedagógica Nacional, Bogotá, Colombia.

*Autor para correspondencia: galigarretom@unal.edu.co; †mcgiraldo@ksu.edu; ‡dgcayons@unal.edu.co; ††lmelo@pedagogica.edu.co

Rec.: 06.05.11 Acep.: 09.09.11

Resumen

La Colección Colombiana de Musáceas (CCM) es la única a nivel mundial que representa un alto valor por ser la que posee introducciones andinas de altura (> 1500 m.s.n.m.). La caracterización de este germoplasma puede generar valor agregado para su utilización en procesos de selección clonal y para el mejoramiento genético de la especie, mediante el uso de materiales diploides con características transmisibles de importancia. Por esta razón, 33 clones de la CCM conservadas in vitro, fueron evaluadas bioquímicamente mediante 10 enzimas, de las cuales cuatro fueron polimórficas: glutamato oxaloacetyl transaminasa (GOT), $\alpha\beta$ -esterasa ($\alpha\beta$ -EST), peroxidasa (PRX) y diaforasa (DIAP). La enzima GOT fue la más discriminante entre grupos genómicos particulares. PRX, DIAP y $\alpha\beta$ -EST permitieron evaluar la variabilidad al interior de cada grupo. El estudio facilita el entendimiento de la estructura genética de los genotipos de plátano y banano cultivados en Colombia.

Palabras clave: Caracterización morfológica, Colombia, isoenzimas, marcadores genéticos, *Musa*, Musaceae.

Abstract

The Colombian Collection of Musaceae (CCM) represents a great value to the world agriculture for being the only one with high Andean germplasm. The characterization of this germplasm can generate added value to use in processes of clone selection and breeding of the species by using diploid materials with desirable traits to be transferred and thus help alleviate food problems in poor countries. For this reason the CCM 33 clones conserved in vitro, were assessed biochemically using 10 enzymes of which four were polymorphic: oxaloacetyl transaminase glutamate (GOT), $\alpha\beta$ -esterase ($\alpha\beta$ -EST), peroxidase (PRX) and diaphorase (DIAP). The GOT enzyme was the most discriminating among individual genomic groups. PRX, $\alpha\beta$ -EST and DIAP allowed us to evaluate the variability within each group. The study provided a better understanding of the genetic structure of the genotypes of plantain and banana grown in Colombia.

Key words: Colombia, genetic markers, isoenzymes, morphological characterization, *Musa*, Musaceae.

Introducción

Los plátanos y bananos (*Musa* spp) son considerados componentes básicos en la alimentación de más de 400 millones de habitantes en las regiones tropicales y subtropicales (Perea, 2003). Colombia es el mayor productor de plátanos de América Latina con 400.000 ha sembradas y una producción de 3,000,000 t/año.

Botánicamente son hierbas gigantes, monocotiledóneas y perennes pertenecientes a la familia Musaceae que comprende los géneros *Ensete* Horan y *Musa* L. El género *Ensete* es monocárpico, con nueve cromosomas básicos y se caracteriza por la ausencia de retoños y frutos no-comestibles. El género *Musa* es el más ampliamente distribuido y comprende cuatro secciones (*Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Callimusa* y *Australimusa*). *Callimusa* y *Australimusa* tienen un número básico de cromosomas de 10 ($2n = 20$), mientras *Eumusa* y *Rhodochlamys* tienen un número básico de 11 ($2n = 22$). Las especies de *Rhodochlamys* y *Callimusa* son principalmente de importancia ornamental y las especies de *Eumusa* y *Australimusa* son las de mayor importancia por producir frutos comestibles (Chandel y Anuradha, 2000; Horry, 2000). La sección *Eumusa*, que incluye bananos y plátanos, muestra una gran variabilidad entre sus especies expresada en la cantidad de formas triploides y tetraploides, amplia distribución geográfica y mayor adopción como cultivo (Belalcázar, 1991; Chandel y Anuradha, 2000). La existencia de esta poliploidía ha originado alguna disparidad en la clasificación exacta entre las subespecies (Simmonds, 1966).

Las especies de bananos y plátanos comestibles se originaron de los cruces interespecíficos de las silvestres *Musa acuminata* Colla (Genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (Genoma B), de las cuales esta última presenta menos variabilidad (Chandel y Anuradha, 2000). *Musa acuminata* sola o en combinación con *Musa balbisiana* son las especies progenitoras de la mayoría de bananos cultivados, los cuales pueden ser diploides ($2n = 22$), triploides ($2n = 33$) o tetraploides ($2n = 44$). En *Musa* las plantas poliploides son más vigorosas, resistentes y de mayor productividad y adaptación que las diploides. La poliploidía se puede

presentar en varios niveles: triploides de *M. acuminata* pura AAA, triploides híbridos de las fórmulas AAB y ABB, tetraploides AAAA, AB BB, AAAB y AAB B (Bakry *et al.*, 2001). Según Simmonds (1979) los clones triploides son resultado de cruces entre diploides, donde uno de los dos produce gametos no reducidos; los tetraploides se desarrollan de un gameto triploide no reducido y uno diploide reducido o de gametos diploides no reducidos, aspecto que es de gran importancia si se quiere determinar a partir de cuáles diploides silvestres se originaron los nuevos grupos y proponer una adecuada taxonomía. Los triploides se designan según los códigos siguientes: (1) AAA para bananos con muy bajo contenido de almidón y mayor contenido de azúcares, (2) AAB para plátanos de cocción con dominancia *acuminata*, (3) ABB para plátanos con dominancia *balbisiana* con alto contenido de almidón y bajo contenido de azúcares. Estos últimos han resultado ser resistentes y tolerantes a sequías y a enfermedades infecciosas como sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, sigatoka amarilla causada por *Mycosphaerella musicola* y moko, causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Purseglove, 1985; Gómez *et al.*, 1987).

Las semillas son muy raras en los bananos y plátanos cultivados y la esterilidad, combinada con la partenocarpia son características de calidad favorables del fruto que, unidas a la propagación vegetativa, han hecho de estas plantas cultivos de interés comercial de primera importancia entre los frutales (León, 1987). El germoplasma natural de estas plantas directamente disponible es un conjunto de aproximadamente 500 clones (De Langhe, 1987), el cual es distribuido por algunas redes de investigación (Bioversity International) a diferentes regiones del mundo, para ser empleado en fomento e investigación (Bakry *et al.*, 2001). Sin embargo, el movimiento acelerado de este germoplasma y la carencia de un acuerdo común entre cultivadores y campesinos sobre la nomenclatura de las diferentes variedades, ha limitado la identificación correcta y completa de cada uno de ellos y el entendimiento de la distribución de su diversidad genética.

La mayor parte de los esfuerzos de la investigación en *Musa* se ha concentrado en mejorar la calidad de la fruta, la condición de enanismo en la planta para contrarrestar su volcamiento, la resistencia a enfermedades y plagas (Bakry *et al.*, 2001; Rodríguez y Cayón, 2008) y la propagación clonal (Perea, 2001). Con el fin de optimizar la investigación en *Musa* se han generado programas de conservación en bancos de germoplasma en condiciones de campo e *in vitro*, ya que ambas facilitan un acceso continuo a los materiales para estudios de sistemática y fitomejoramiento y para el mantenimiento de una base genética amplia (De Langhe, 1987). La Colección Colombiana de Musáceas (CCM) en condiciones de campo, ubicada anteriormente en el Centro Experimental El Agrado (Montenegro, Quindío) y actualmente en el Centro de Investigación Palmira (Palmira, Valle) cuenta con más de 140 introducciones entre diploides (AA, BB, AB), triploides (AAA, AAB, ABB) y tetraploides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) todas ellas caracterizadas por métodos morfológicos, agronómicos y moleculares. La CCM en condiciones *in vitro* se encuentra en el Centro de Investigación Tibaitatá (Mosquera, Cundinamarca) y tiene 145 materiales clonales, la mayoría provenientes de la CCM y establecida en campo.

En las especies de reproducción exclusivamente vegetativa como plátano y banano, las colecciones de germoplasma son de vital importancia para la identificación, conservación, intercambio, caracterización y evaluación de los genotipos que las integran y deben ser objeto de estudios continuos para evaluar su rango de diversidad genética. Estas colecciones deben ser mantenidas en condiciones de campo e *in vitro* ya que son los métodos de conservación necesarios para la propagación vegetativa de las plantas. Los riesgos de la conservación *in vitro* radican en la presencia usual de variación somaclonal y la necesidad de regeneración frecuente (Karamura, 1999); mientras que en las colecciones de campo estos riesgos están representados por plagas, enfermedades y desastres naturales (Horry, 2000).

Tradicionalmente, la caracterización y clasificación de las musáceas se ha logrado

mediante el uso de descriptores morfológicos (Simmonds y Shepherd, 1955; Stover y Simmonds, 1962) lo que implica la comparación del material genético basada en fenotipos visibles (forma, tamaño y colores) del seudotallo, hojas, racimo y frutos. Aunque estas características clásicas son todavía muy útiles, la eficiencia de identificación de las plantas puede reducirse por la edad, la etapa de desarrollo o los efectos ambientales sobre las características medidas (Bhat *et al.*, 1995a). Debido a la naturaleza subjetiva de esta clasificación, los científicos están ahora complementándola con técnicas moleculares para la caracterización de los grupos de *Musa* que incluyen la diversidad de contenidos y el perfil de antocianinas (Horry y Jay, 1988), polimorfismo de enzimas (Bonner *et al.*, 1974; Bhat *et al.*, 1992a), heterogeneidad de longitud de espacios ('spacer-length') de rARN (Lannaud *et al.*, 1992), polimorfismos de ADN de cloroplastos (Gawel *et al.*, 1992), RFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción) (Jarret *et al.*, 1992; Bhat *et al.*, 1995b), RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) (Jarret *et al.*, 1993; Bhat y Jarret, 1995), VNTR (número variable de repeticiones en tándem) (Kaemmer *et al.*, 1993), SSR (secuencias simples repetitivas) y AFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados) (Nadal *et al.*, 2008). El desarrollo de estos nuevos métodos de clasificación genética, particularmente el polimorfismo de enzimas, RFLP y RAPD, ha permitido el conocimiento más detallado y profundo del género *Musa* (Quiroz, 1991). El empleo de isoenzimas como marcadores genéticos ha resultado útil para la detección de duplicados, estimación en poco tiempo de la variabilidad genética e identificación clonal de un gran número de materiales con una inversión económica menor que la demandada por técnicas moleculares, no obstante, la información genética puede ser en algunos casos de menor veracidad comparada con algunas técnicas moleculares, dado que el proceso de extracción puede tener algún grado de efecto de ambiente.

El objetivo de este estudio fue analizar la variabilidad genética de la Colección Colombiana de Musáceas (CCM) mediante la caracterización bioquímica de 33 clones del banco base *in vitro*.

Materiales y métodos

Material vegetal

En el proceso de conformación del banco base de germoplasma in vitro de la CCM, formado por 145 materiales clonales, se incorporaron algunos materiales que por parámetros morfológicos y fisiológicos representan la alta variabilidad de la colección. Se micropropagaron 66 clones provenientes de la CCM en campo del Centro Experimental El Agrado (Montenegro, Quindío), para ser incluidos en el banco base in vitro, y de estos se emplearon para la caracterización bioquímica los 33 clones que presentaron mayor respuesta en la conservación in vitro (Cuadro 1).

Antes de la extracción de las muestras de tejidos para análisis bioquímicos se evalua-

ron previamente las condiciones fisiológicas y físicas del material conservado in vitro y las de almacenamiento (temperatura y luz). Generalmente, cualquier tejido de la planta (hojas, raíces, tallos, semillas, organelos celulares) sirve para estudios enzimáticos, no obstante es importante tener en cuenta que los metabolitos secundarios pueden causar oxidación de los tejidos. Para la extracción se tomaron muestras de tejido de 0.5 g de toda la plántula y se maceraron con buffer de extracción Tris HCl 0,05M pH 8.3 (Ramírez *et al.*, 1987) en proporción 1:2. Los extractos crudos fueron centrifugados a 14 000 g_n y 4 °C por 20 min y posteriormente se tomaron alícuotas del sobrenadante en dos tubos Eppendorf que se almacenaron a 0 °C para su uso posterior.

Cuadro 1. Clones de la Colección Colombiana de Musáceas evaluados por isoenzimas.

Nombre	Sección	Subgrupo	Genoma
1. Red Yade	Eumusa	Plantain	AAB
2. K.W.A.	Eumusa	Plantain	AAB
3. Madre del platanal	Eumusa	Plantain	AAB
4. Dominico Maqueño	Eumusa	Plantain	AAB
5. Dominico 300	Eumusa	Plantain	AAB
6. Diby	Eumusa	Plantain	AAB
7. Hartón de Santander	Eumusa	Plantain	AAB
8. Dominico Caoba	Eumusa	Plantain	AAB
9. Pelipita	Eumusa	Pelipita	ABB
10. Messiatza	Eumusa	Plantain	AAB
11. Njock kon	Eumusa	Plantain	AAB
12. Dominico Enano	Eumusa	Plantain	AAB
13. Hartón Común	Eumusa	Plantain	AAB
14. Plantain 17	Eumusa	Plantain	AAB
15. Hartón Birracimo	Eumusa	Plantain	AAB
16. Amou	Eumusa	Plantain	AAB
17. Kelong mekintu	Eumusa	Plantain	AAB
18. Pompo Comino	Eumusa	Popoulou	AAB
19. FHIA 2	Eumusa	Indefinido	AAAA
20. Cachaco Enano	Eumusa	Bluggoe	ABB
21. Bend mossendjo	Eumusa	Plantain	AAB
22. Dominico Mutant rojo	Eumusa	Plantain	AAB
23. Dominico Guaicoso	Eumusa	Plantain	AAB
24. IC 2	Eumusa	Gros Michel	AAAA
25. Dominico Ancuyan	Eumusa	Plantain	AAB
26. Rose D'ekona	Eumusa	Plantain	AAB
27. Dominico Común	Eumusa	Plantain	AAB
28. FHIA 3	Eumusa	Indefinido	AABB
29. <i>Musa laterita</i>	Rhodoclamys	–	–
30. Bocadillo Chileno	Eumusa	Sucrier	AA
31. Popoulou	Eumusa	Popoulou	AAB
32. Saba	Eumusa	Saba	ABB
33. ¾ Nain	Eumusa	Plantain	AAB

Corrida electroforética

Se utilizó un sistema discontinuo en geles de poliacrilamida a 10% (p/v) y 4% (p/v), con el sistema tampón Tris-Borato pH:9.0 propuesto por Ramírez *et al.* (1987). Las condiciones utilizadas en la electroforesis fueron las siguientes: 250 V y 25 W, iniciando el proceso con una corriente de 15 mA hasta que las muestras entraron al gel de separación y luego se incrementó 5 mA cada 10 min hasta alcanzar 25 mA finales por gel. La electroforesis se terminó 15 min después que el indicador de corrida (azul de bromofenol) comenzó a salir del gel de separación, entre 6 y 7 h más tarde.

Como marcadores enzimáticos se evaluaron diez enzimas: glutamato oxaloacetil transaminasa (GOT), shikímico dehidrogenasa (SKDH), enzima málica (ME), $\alpha\beta$ -esterasa ($\alpha\beta$ -EST), peroxidasa (PRX), diaforasa (DIAP), 6-fosfogluconato dehidrogenasa (6-PGDH), malato dehidrogenasa (MDH), fosfogluconato isomerasa (PGI) y fosfatasa ácida (ACP); los protocolos de tinción enzimática utilizados fueron los propuestos por Ramírez *et al.* (1987).

Análisis estadístico

Con base en los zimogramas obtenidos con cada una de las enzimas analizadas, se realizó la lectura de los patrones de bandeo, expresando numéricamente como 1 = presencia ó, 0 = ausencia. Con estos datos se organizó una matriz básica de datos (MBD). Luego se analizaron los datos de las enzimas más polimórficas por medio del programa NTSYS-*pc* (Rohlf, 2007), con el uso del coeficiente de similitud de Nei (Dice), con el cual se efectuaron los agrupamientos con el método de ligamiento promedio no-ponderado (UPGMA) (Crisci, 1983).

Resultados y discusión

En el análisis bioquímico se observó que el extracto más eficiente para la separación y definición electroforética se obtuvo a partir de una plántula de tres semanas de propagación *in vitro*, aproximadamente, lo que disminuyó el porcentaje de oxidación en las muestras. De los diez sistemas enzimáticos utilizados como marcadores, (GOT, $\alpha\beta$ -EST, DIAP, PRX,

ME, SKDH, MDH, 6-PGDH, PGI y ACP); los sistemas PGI y ACP no presentaron actividad enzimática y las enzimas 6-PGDH, ME, SKDH y MDH no revelaron patrones polimórficos consistentes. Por consiguiente, la colección se analizó por parámetros estadísticos usando matrices de datos de las cuatro enzimas más polimórficas (GOT, $\alpha\beta$ -EST, PRX y DIAP), y en este orden se presentan los resultados obtenidos con cada enzima.

Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT)

Se encontraron tres zonas de actividad que corresponden a los tres loci reportados por Jarret y Litz (1986) (Figura 1a) y al igual que ellos, los loci GOT-1 y GOT-2 presentaron un comportamiento monomórfico, por tanto para el análisis se tomó sólo el locus GOT-3, de estructura dimérica, presentando un patrón compuesto por tres bandas polimórficas, como se representa en la Figura 1b.

$\alpha\beta$ -Esterasa ($\alpha\beta$ -EST)

De todas las enzimas evaluadas fue la más polimórfica, con un número total de catorce bandas, como se observa en la Figura 2. Para esta enzima se definieron siete zonas de actividad que corresponden a: (1) zona A, para las bandas 1 y 2; (2) zona B, bandas 3 y 4; (3) zona C, corresponde a las bandas 5 y 6; (4) zona D: para las bandas 7 y 8; (5) zona E, para las bandas 9 y 10; (6) zona F, a las bandas 11 y 12 y (7) zona G, que corresponde a las bandas 13 y 14. La banda 9 es única para el material *M. laterita* y la banda 10 se evidencia sólo en los híbridos Rose D'ekona y Dominico Común (Figura 2a).

Peroxidasa (PRX)

Se definieron tres zonas de actividad A, B y C (Figura 3a), de las cuales se tomó para el análisis estadístico la zona C con dos bandas polimórficas como se observa en la Figura 3b, debido a que las zonas A y B no presentaron patrones consistentes para el análisis.

Diaforasa (DIAP)

Se definieron cuatro zonas de actividad, A, B, C y D (Figura 4), donde las bandas polimórficas 1 y 2 corresponden a la zona A; 3 y 4 a la zona B; la zona C, inconsistente, comprende

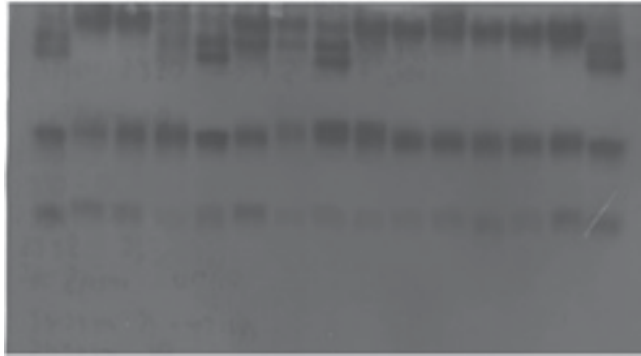


Figura 1a. Polimorfismo revelado por la enzima GOT



Figura 1b. Zimograma del patrón de bandas presentado por la enzima GOT.

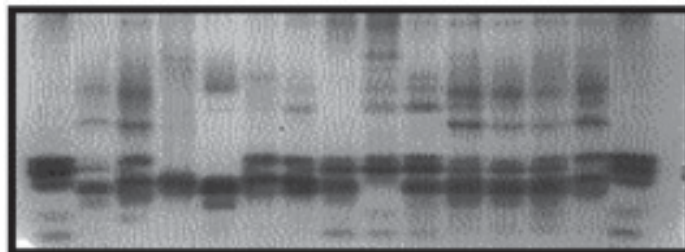


Figura 2. Polimorfismo revelado por la enzima EST

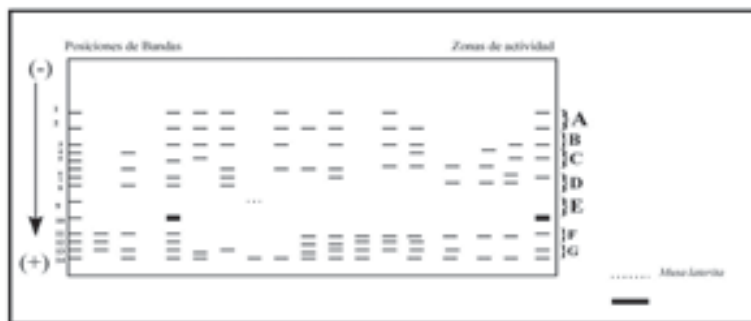


Figura 2a. Zimograma del patrón de bandas presentado por la enzima EST

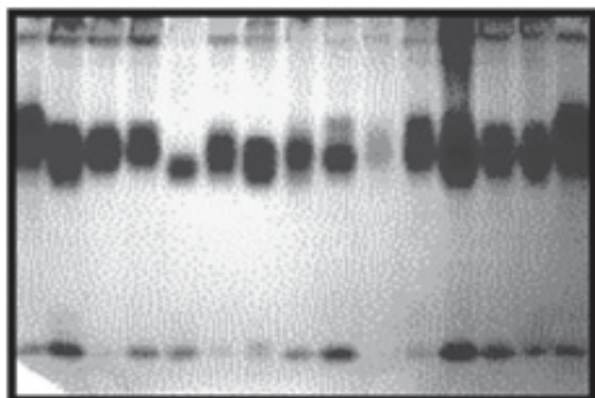


Figura 3a. Polimorfismo revelado por la enzima PRX.

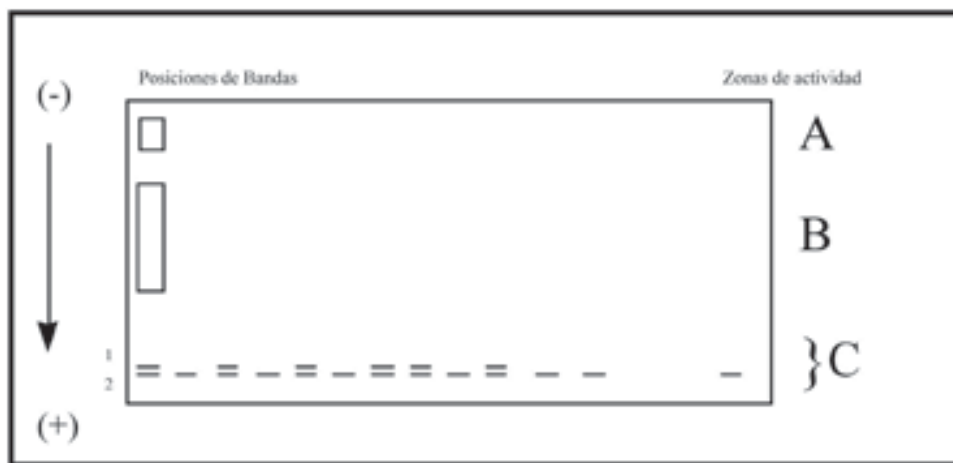


Figura 3b. Zimograma del patrón de bandas presentado por la enzima PRX.

las bandas 5 y 6; y la zona D está constituida por las bandas polimórficas 7 y 8. Para el análisis se tomaron las zonas A, B, y D, por ser las que presentaron mayor polimorfismo, resolución y consistencia en los patrones de bandeado (Figura 4a).

En el Cuadro 2 se hace referencia al número de alelos por locus o zona de actividad revelados por las cuatro enzimas polimórficas evaluadas. Del análisis estadístico con todas las enzimas se obtuvieron nueve grupos, en los cuales se separan los grupos genómicos así: Plantain (AAB), Popoulou (AAB), Pelipita (ABB) y la especie *M. laterita*, y se agrupan otros materiales como Bocadillo Chileno (AA) y FHIA 03 (AABB), IC2-Gros Michel (AAAA), Saba (ABB) y Cachaco Enano (ABB) (Figura 5).

A partir de estos resultados se puede inferir que las enzimas ME y SKDH no son recomendables para estudios de diversidad en *Musa* por presentar un patrón de bandas monomórfico que no permite evaluar el grado de variabilidad inter o intraespecífica, al igual que MDH y 6-PGDH ya que se comportaron de forma inconsistente en el revelado. Las enzimas $\alpha\beta$ -EST, PRX y DIAP presentaron un polimorfismo aprovechable para la caracterización, posibilitando una mayor discriminación dentro de los grupos. La enzima GOT, aunque reveló un polimorfismo menor que las anteriores, permite evaluar la variabilidad entre los diferentes grupos genómicos de la CCM.

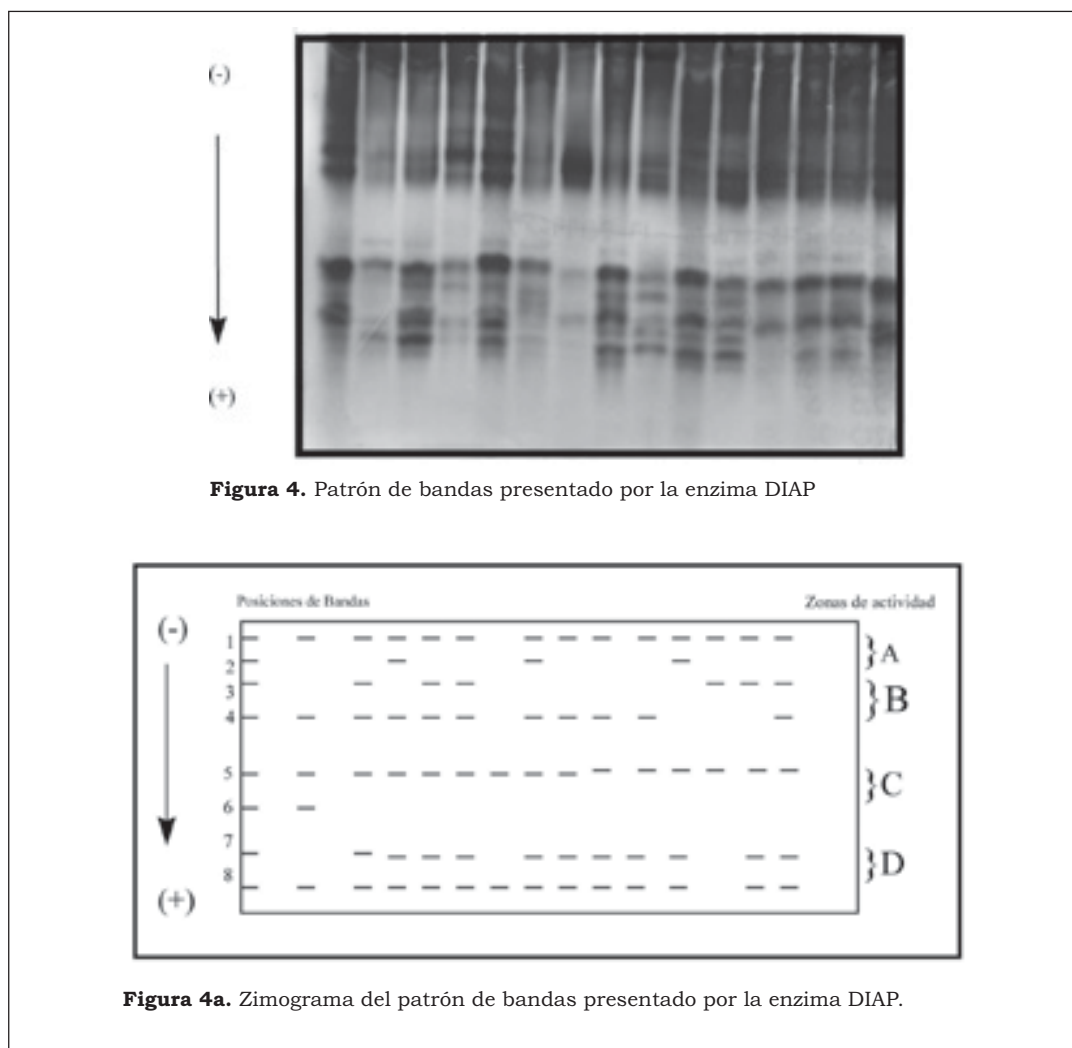


Figura 4. Patrón de bandas presentado por la enzima DIAP

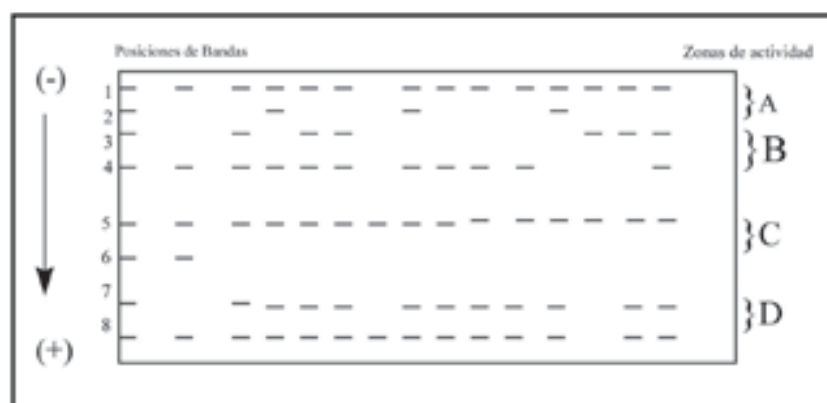


Figura 4a. Zimograma del patrón de bandas presentado por la enzima DIAP.

Cuadro 2. Número de alelos por locus o zonas de actividad revelados por enzimas polimórficas.

Enzima	Locus	Zonas	Alelos o bandas
GOT	GOT-1		100
	GOT-2		100
	GOT-3		100, 97, 94
EST		A	100, 95
		B	91, 88
		C	87, 85
		D	83, 78
		E	75, 72
		F	68, 64
		G	59, 55
DIAP		A	100, 95
		B	81, 76
		C	71, 66
		D	61, 56
PRX		A*	-
		B*	-
		C	102, 100

*zonas de poca resolución en el bandeo.

El polimorfismo obtenido con las cuatro enzimas consideradas permite predecir que al interior de la CCM existe una variabilidad significativa y que es posible detectar la variabilidad presente de los diferentes grupos genómicos con las enzimas DIAP, PRX y $\alpha\beta$ -EST. A partir del patrón de bandeo presentado por la enzima $\alpha\beta$ -EST, sin un estudio de herencia, se puede deducir que, posiblemente, la estructura de la enzima para las siete zonas (A, B, C, D, E, F y G) es monomérica (Figura 2). Dentro del grupo Plantain (AAB) con las cuatro enzimas utilizadas para el análisis estadístico fue posible discriminar algunos genotipos y detectar tres grupos como posibles duplicados: uno constituido por Bend Mossendjo y Dominicó Ancuyano, otro por Plantain 17 y Hartón Birracimo, y el tercero compuesto por Dominicó Maqueño y Dominicó 300 (Figura 5).

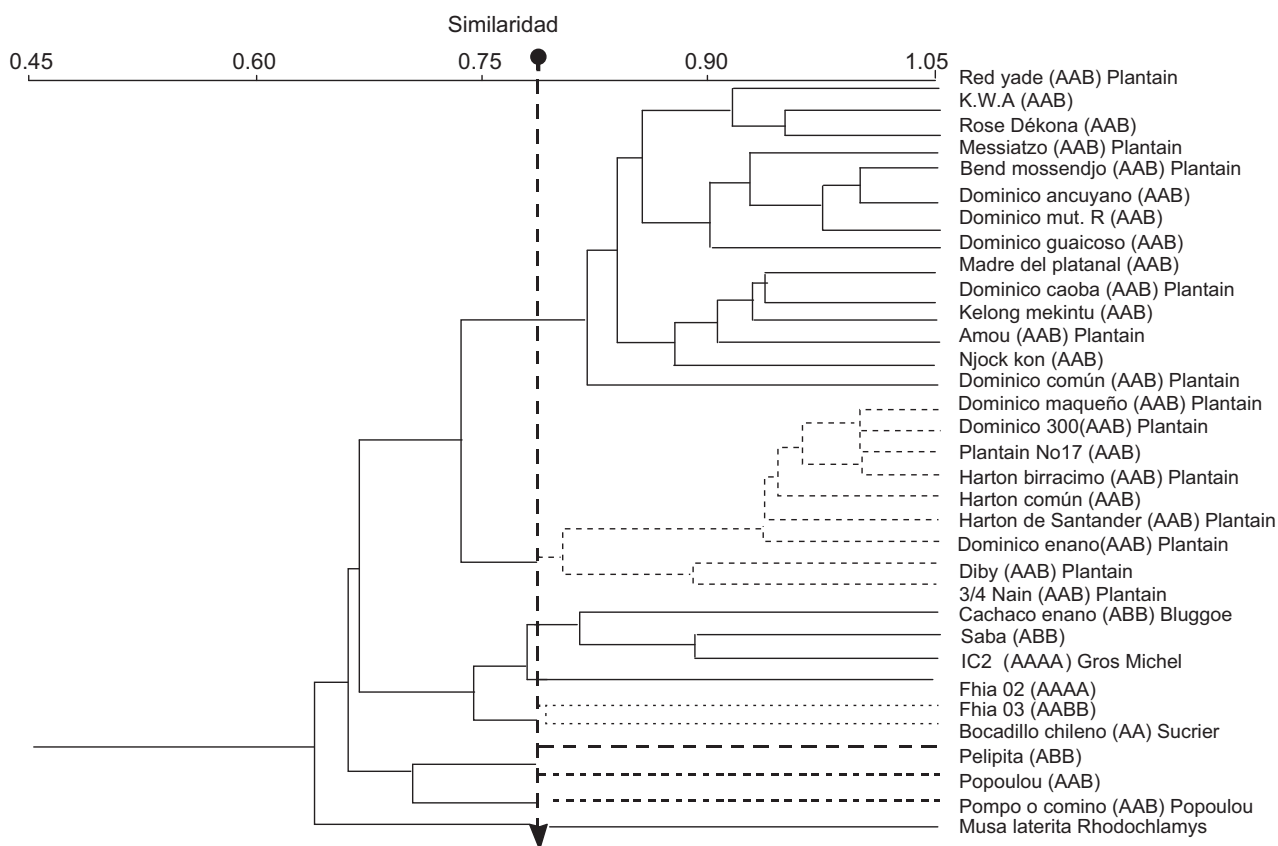


Figura 5. Análisis de agrupamiento para las cuatro enzimas analizadas con su respectivo grupo genómico.

La banda 10 $\alpha\beta$ -EST (Figura 2a) sugiere la existencia de una característica única en los clones Rose D'ekona y Dominico Común, lo que podría ser interesante si se logra hacer una correlación de esta banda con un carácter morfoagronómico de importancia. Adicionalmente, el polimorfismo presentado por esta enzima permite diferenciar claramente a la especie *M. laterita*, de la sección *Rhodochlamys* (Figura 2a) por la banda 9, única de los clones pertenecientes a la sección *Eumusasa*.

Los patrones presentados por la enzima DIAP en las zonas A, B, C y D corresponden, posiblemente, a una estructura monomérica (Figura 4a). De todas las enzimas evaluadas, DIAP es la única que permite evaluar la variabilidad al interior del grupo Plantain, separando los materiales Dominico Común, Dominico Enano, Dominico Guaicoso y Diby como clones únicos dentro del núcleo común de los Plantain; adicionalmente, muestra

cuatro materiales de otros grupos genómicos interesantes por presentar patrones únicos como son: Cachaco Enano (Bluggoe), Bocadillo Chileno (Sucrier), Popoulou (Popoulou) y Pompo Comino (Popoulou). Lo anterior indica que se trata de materiales con una variabilidad muy útil para programas de mejoramiento genético, por tanto es interesante conocer otras características fisiológicas y/o morfológicas que permitan hacer correlaciones de los mismos con los patrones bioquímicos únicos que los separan del resto de la colección.

El locus GOT-3 y la zona C de la enzima PRX reflejan, posiblemente, una estructura dimérica y monomérica, respectivamente, como se observa en las Figuras 1 y 3. El polimorfismo mostrado por la enzima GOT es insuficiente para un estudio de caracterización ya que sólo permite observar diferencias entre los grupos genómicos y no al interior de cada uno de ellos. Esta enzima presenta una expresión estable que hace posible comparar

los resultados, independientemente de las condiciones necesarias para su obtención, como son: buffer de extracción, buffer de corrida y clase de gel, siendo éste un comportamiento similar al conseguido por Jarret y Litz (1986).

El polimorfismo observado con la enzima PRX permite separar los materiales FHIA 02 y Pompo Comino, al presentar un patrón de bandas peculiar que los hace formar grupos distintos y únicos, lo que sugiere la riqueza genética que encierran estos clones. Un estudio del polimorfismo de isoenzimas en setenta cultivares de *Musa*, pertenecientes a los grupos genómicos AB, AAA, AAB y ABB, mostró que siete sistemas enzimáticos fueron apropiados para la identificación de los cultivares (Bhat *et al.*, 1992 a,b). Aunque la ampliación del polimorfismo observado fue alta, no fue suficiente para distinguir todos los cultivares analizados ya que el 25% de estos compartieron el mismo perfil isoenzimático.

En el análisis elaborado con todas las enzimas, los materiales de banano se distribuyeron formando tres grupos: (1) constituido por FHIA 03 y Bocado Chino, (2) constituido por Cachaco Enano, Saba e IC2, Gros Michel y (3) constituido solo por FHIA 02 (Figura 5). Para el primer grupo es de esperar que el material FHIA 03 se agrupe con Bocado Chino, ya que es un clon híbrido derivado de dos progenitores de genoma AAB y AA, y Bocado Chino es de genoma AA. Esto permite observar la posible dominancia del genoma *acuminata*, lo cual sería de interés para cruces en los que se busque aumentar la variabilidad de los bananos comerciales, si se tiene en cuenta que un diploide AA, como es el caso de Bocado Chino, representa un genoma más cercano a los parientes silvestres o ancestrales de los bananos cultivados actuales. En el segundo grupo, los materiales Cachaco Enano y Saba, plátanos con genoma ABB, se agrupan con el banano IC2-GrosMichel, de genoma AAAA, un banano calidad exportación. Si se tiene en cuenta que Saba es uno de los pocos plátanos que se pueden consumir maduros como fruta y que los resultados bioquímicos lo agrupan en calidad exportación, se estaría confirmando la dominancia del genoma *acuminata* para estos dos plátanos, lo cual los hace interesantes para

el mejoramiento. El tercer grupo, conformado por FHIA 02, confirma que este material es de gran relevancia para el mejoramiento en musáceas. La caracterización isoenzimática con electroforesis de isoenzimas permite agrupar los plátanos colombianos con un mínimo de variabilidad genética, como descendientes de una o dos ramas comunes, diferenciándolas de las introducciones recientes del Oeste africano, las cuales también revelan entre sí un agrupamiento estrecho. Esto muestra la existencia de plátanos que han evolucionado, adaptándose a diferentes agroecosistemas colombianos (Rosales y Pocasangre, 2002).

Estos resultados indican que existe alta variabilidad al interior del grupo de los bananos ya que, a pesar de tener un bajo número de clones representados en la colección de estudio, la mayoría se separan como materiales únicos al realizar el análisis con todas las enzimas. También se encontró que las isoenzimas tienen buen potencial para la discriminación de los cultivares de *Musa*, estudios que se pueden complementar con los marcadores moleculares para la diferenciación entre los grupos *acuminata* y *balbisiana* y para entender las relaciones estrechas de variabilidad entre los cultivares de plátano (Sánchez *et al.*, 1998). Los resultados de este trabajo también confirman lo expuesto por Chandel y Anuradha (2000) quienes sostienen que la caracterización genética es esencial para el desarrollo de estrategias científicas para la conservación del germoplasma de plátano y banano en colecciones.

Conclusiones

- Las enzimas $\alpha\beta$ -EST, PRX y DIAP son óptimas para evaluar variabilidad en *Musa* spp y podrían ser marcadores enzimáticos eficientes, mientras GOT es una enzima estable y su expresión no depende de las condiciones de extracción o corrida.
- Los clones FHIA 02 y Pompo Comino representan una fuente importante de variabilidad dentro de la CCM, mientras que entre los clones Plantain 17 y Hartón Birracimo, Dominico 300 y Dominico Maqueño, al igual que entre Bend Mossendjo y Dominico Ancuyano, posiblemente exista una relación de duplicación.

- El número de clones presente por cada grupo genómico en la CCM y los resultados de los análisis con todas las enzimas sugieren la necesidad de incorporar un mayor número de clones tradicionales cultivados y silvestres para confirmar la clasificación de los materiales ya existentes y, adicionalmente, aumentar la variabilidad genética por grupo genómico en la Colección Colombiana de Musáceas.

Referencias

- Bakry, F.; Carreel, F.; Caruana, M. L.; Côte, F.; Jenny, C.; y Tezenas, H. 2001. Banana. En: Charrier, A.; Jacquot, M. Hamon, S.; y Nicolas, D. (eds.). Tropical plant breeding, CIRAD-SPI, Montpellier, France. p.1-29.
- Bhat, K. V.; Bhat, S. R.; y Chandel, K. P. 1992a. Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. I. Esterase, acid phosphatase and catalase. *J. Hort. Sci.* 67:501 - 507.
- Bhat, K. V.; Bhat, S. R.; Chandel, K. P. 1992b. Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. II. Peroxidase, superoxide dismutase, shikimate dehydrogenase and malate dehydrogenase. *J. Hort. Sci.* 67:737 - 744.
- Bhat, K. V. y Jarret, R. L. 1995. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. *Genet. Res. Crop Evol.* 42:107 - 118.
- Bhat, K. V.; Jarret, R. L.; y Rana, R. S. 1995a. DNA profiling of banana and plantain cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Electrophoresis* 16:1736 - 1745.
- Bhat, K. V.; Bhat, S. R.; Chandel, K. P.; Lakhanpaul, S.; y Ali, S. 1995b. DNA fingerprinting in *Musa* cultivars with oligodeoxyribonucleotide probes specific for simple repeat motifs. *Genet. Anal.* 12: 45-51.
- Belalcázar, S. (ed.). 1991. El Cultivo de plátano (*Musa* AAB Simmonds) en el trópico. Manual de asistencia técnica No. 50. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Ed. Feriva. Cali. p. 45-89
- Bonner, J. W.; Warner, R. M.; y Brewmarker, J. L. 1974. A chemostatic study of *Musa* cultivars. *HortSci.* 9:325 - 328.
- Chandel, K. P. y Anuradha, A. 2000. Genetic resources of banana in India: collection in vitro conservation and characterization. En: Shing, H.P. y Chadha, K.L. (eds.). Banana – Improvement, Production & Utilization. Proceedings of the Conference on Challenges for Banana and Utilization in 21st Century. Association for the Improvement in Production and Utilization of Banana (AUIPUB). National Research Centre on Banana (NRCB), Tricy, India, p. 128-135.
- Crisci, J.V. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica, Washington, D.C., 133 p.
- De Langhe, E. 1987. Necesidad de una estrategia Internacional para el mejoramiento genético del banano y del plátano. En: Jaramillo, R. y Mateo, N. (eds.). Memorias de la reunión regional del INIBAP para América Latina y el Caribe. Costa Rica. p. 181-199.
- Gawel, N. J.; Jarret, R. L.; y Wittermore, A. 1992. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-based phylogenetic analysis of *Musa*. *Theor. Appl. Genet.* 84:286 - 290.
- Horry, J. P. y Jay, M., 1988. Distribution of anthocyanin in wild and cultivated banana varieties. *Phytochemical* 27:2667 - 2672.
- Horry, J.P. 2000. Status and characterization of banana genetic resources. En: Shing, H.P. y Chadha, K. L. (eds.). Banana – Improvement, Production & Utilization. Proceedings of the Conference on Challenges for Banana and Utilization in 21st Century. Association for the Improvement in Production and Utilization of Banana (AUIPUB). National Research Centre on Banana (NRCB), Tricy, India. p. 117 - 127.
- Jarret, R. L. y Litz, R. E. 1986. Isoenzymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica* 35:539 - 549.
- Jarret, R. L.; Gawel, N. J.; y Wittermore, A. 1992. RFLP-based phylogeny of *Musa* species in Papua New Guinea. *Theor. Appl. Genet.* 84:579 - 584.
- Jarret, R. L.; Vulysteke, D.; Gawel, N. J.; Pimentel, R.; y Dunbar, L. 1993. Detecting genetic diversity in diploid bananas using PCR and primers from a highly repetitive DNA sequence. *Euphytica* 68:69 - 76.
- Kaemmer, D.; Afza, R.; Weisang, K.; Kahl, G.; y Novak, F. J. 1993. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Biotechnol.* 10:1030 - 1035.
- Karamura, D. A. 1999. Numerical taxonomic studies of the east African highland bananas (*Musa* AAA-East Africa) in Uganda. Ph.D. Thesis, The University of Reading. IPGRI, INIBAP, Montpellier, Francia. 192 p.
- Lannaud, C.; Tezenas, H.; Jolivot, M.P.; Glaszmann, J.C.; y González de León, D. 1992. Variation of ribosomal gene spacer length among wild and cultivated bananas. *Hered.* 68:147 - 156.
- Gómez, P. L.; Belalcázar, S.; y Martínez, A. 1987. Programa de plátano y banano en Colombia - Marco Orientador-. En: Jaramillo, R. y Mateo, N. (eds.). Memorias de la reunión regional del INIBAP

- para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. p. 52-74.
- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. p. 88-92.
- Nadal, R.; Manzo, G.; Orozco, J.; Orozco, M.; y Guzmán, S. 2008. Diversidad genética de clones de bananos y plátanos (*Musa* spp.) usando marcadores RAPD. En: XVIII Reunión de la Asociación para la Cooperación en Investigaciones de Banano en el Caribe y en América Tropical (ACORBAT), Guayaquil, Ecuador. 9 p. Memorias CD Rom
- Perea, M. 2001. La biotecnología como soporte en el mejoramiento de las musáceas. En: Biotecnología agrícola, un enfoque hacia el mejoramiento de plantas. Editora Guadalupe, Bogotá, Colombia. p. 138 - 149.
- Perea, M. 2003. Biotecnología, bananos y plátanos. Editora Guadalupe, Bogotá. 228 p.
- Purseglove, J. W. 1985. Crops Monocotyledons. Longman Group Limited, Singapore. p. 343 - 384.
- Quiroz, C. F. 1991. Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos. En: Roca, W. y Mroginski L.A. (eds.). Cultivo de tejidos vegetales en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali. p. 858 - 876.
- Ramírez, H.; Hussain, A.; Roca, W.; y Bushuk, W. 1987 Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. Euphytica 36:39 - 48.
- Rosales, F. y Pocasangre, L. 2002. Oferta tecnológica de banano y plátano para América Latina y el Caribe. Una contribución de Musalac a la investigación y desarrollo de las Musáceas. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, INIBAP. Montpellier, Francia. 29 p.
- Rodríguez, P. A. y Cayón, G. 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. Agronomía Colombiana 2 (2):256 - 265.
- Rohlf, F. J. 2007. NTSYS. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Versión 2.1. Exeter Publications, Setauket, Nueva York. 31 p.
- Sánchez, I.; Gaviria, D.; Gallego, G.; Reyes, L. M.; Giraldo, M.C.; Fajardo, D.; Valencia, J. A.; Lobo, M.; Tohme, J.; y Roca, W.. 1998. Caracterización bioquímica y molecular de la colección colombiana de musáceas. En: Giraldo, M. J.; Belalcázar, S. L.; Cayón, D. G.; y Botero, R. G. (eds.). Seminario Internacional sobre Producción de Plátano. Corpoica, Universidad del Quindío, Comité de Cafeteros del Quindío, Sena, Armenia, Colombia. Memorias. p. 26 - 31.
- Simmonds, N. W. y Shepherd, K. 1955. The taxonomy and origins of cultivated bananas. J. Linn. Soc. (Bot). Londres 55:302 - 312.
- Simmonds, N. W. 1966. Bananas. Longman, Londres. 468 p.
- Simmonds, N.W. 1979. Evolutions of crop plants. Edinburgh School of Agriculture. Longman, Londres.
- Stover, R. H. y Simmonds, N. W. 1962. Bananas. 3rd ed. Longman, Nueva York.