

Identificación de Polimorfismo de Peroxidasas
en callos de *Saccharum officinarum* L.
obtenidos por organogénesis somática
empleando el 2,4-diclorofenoxiacético.

Polymorphism identification corns peroxidases in
Saccharum officinarum L. somatic organogenesis
obtained by using 2,4-dichlorophenoxyacetic.

Carlos A. Nomberto Rodríguez

Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ.

untcarlos@hotmail.com

Carlos León Torres, Steban Ilich Zerpa, Doris Mercado Paredes.

Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ.

Cecilia Betzabet Bardales Vásquez.

Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, PERÚ

Resumen

El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar el efecto del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en la inducción de callos y variabilidad genética en tres variedades de “caña de azúcar” (*Saccharum officinarum* L.) H.32-8560, H.50-7209 y H.57-5174. Para el estudio se formularon tres medios de cultivo *in vitro*, utilizando como base las sales de Murashige-Skoog (1962) y suplementado con el 10uM; 20uM y 30uM de 2,4-D, para cada medio respectivamente. Los resultados evidencian que el 2,4-D muestra un efecto inductor en cada una de las variedades, sin embargo, este efecto depende de su concentración en el medio y la capacidad de respuesta de la variedad empleada. Se determinó que la concentración de 10uM y 20uM tienen mayor capacidad de inducir callos en la variedad H.32-8560 y menor en las otras dos variedades. El análisis del polimorfismo para peroxidasas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en placa vertical, revelando un polimorfismo de bandas diferente, para cada una de las variedades en estudio. De acuerdo a los resultados en este trabajo se demostró la capacidad del 2,4-Diclorofenoxiacético para inducir callos y generar variación genética en “caña de azúcar”, en las variedades utilizadas en el presente trabajo.

Palabras clave: Polimorfismo, peroxidasas, callos, 2,4-diclorofenoxiacético, organogénesis.

Abstract

The present I work was I realize for the sake of studying the effect of the 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4 -D) in the induction of corns and genetic variability in three varieties of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) H.32-8560, H.50-7209 and H.57-5174. For the study formulated him three means of cultivation *in vitro*, using like base Murashige Skoog's salts (1962) and supplemented with the 10uM; 20uM and 30uM of 2.4 D, for each means respectively. The results evidenced than 2.4-D an inducing effect in each of varieties showed , however this effect depends on its concentration in the middle and the capability of answer of the used variety. Was determine that the concentration of 10uM and 20uM have bigger capability of inducing corns in variety H.32-8560 and minor in the others two varieties. The analysis of the polymorphism for peroxidasas was realize by means of electroforesis in gel of poliacrilamida in vertical plate, revealing a different polymorphism of bands, for each of the varieties under consideration. The induce corns and to generate genetic variation in sugar cane, in the varieties used in the present demonstrated the capability of 2.4 itself according to the results in this work .

Key words: Polymorphism, peroxidases, corns, 2,4-dichlorophenoxyacetic, organogenesis.

Introducción

Desde tiempos ancestrales, la “caña de azúcar” ha sido considerada como una planta milagrosa, que aunque originaria del Asia (según los textos históricos de mayor aceptación), hoy se cultiva en más de un centenar de países (predominantemente situados entre los trópicos), de los cinco continentes lo que le confiere categoría de universalidad, gracias al espíritu aventurero y de dominio que el hombre, a través del tiempo, ha ejercido en sus hazañas de exploración, descubrimientos y conquistas de los espacios territoriales del planeta.

Con la Era industrial, la “caña de azúcar” se convirtió en un símbolo de poder y prosperidad económica en los países donde se ha extendido su cultivo, jerarquizando el “azúcar” (principal producto de la “caña”), como la mercancía con mayor poder de negocio o intercambios comerciales para los países que tienen el privilegio de cultivarla, en los últimos 15 años la producción de azúcar en el mundo superó los 50 000 000 TM, destacándose Brasil, Cuba, India, Méjico, como los mejores productores del mundo, el Perú aun cuando su producción

alcanzó las 500 000 TM le permite situarse entre los 20 países. Sin embargo, constituye uno de los cultivos de mayor importancia en la economía del país.

Como es ampliamente conocido, la obtención de tasas de producción y productividad de un cultivo depende de un conjunto de factores que se involucran de una manera compleja entre sí: El disponer de genotipos que aseguren altos rendimientos y gran adaptabilidad a condiciones estresantes externas y probada resistencia a enfermedades, constituye un factor que conlleva a una situación agronómica óptima (Lat *et al.*, 1993).

El mejoramiento tradicional de la "caña de azúcar", se realiza mediante la producción de híbridos. No obstante, este procedimiento requiere de 10 a 15 años y variedades de comprobada adaptabilidad y rendimiento obtenido a través de éste proceso, han mostrado con el tiempo susceptibilidad a enfermedades introducidas. Es así, que con el uso de técnicas de cultivo *in vitro* e inducción de mutaciones, se puede en corto tiempo inducir en estas plantas características de interés, como la resistencia a enfermedades tal como al "mosaico de la caña de azúcar" (SCMV), sin alterar las de comprobada adaptabilidad y rendimiento. Todo mejoramiento de una planta, consiste sin duda alguna, en la mejor utilización de la variabilidad (González, 1983).

La variación genética constituye la materia prima de los organismos vivos sobre los cuales ha influido la evolución natural y/o la evolución dirigida que el hombre ha realizado para beneficio. Con la elucidación de consideraciones teóricas de tipo y dosis de mutágenos y la manera de presentarse las mutaciones genéticas, la mutagénesis, se convirtió de una excentricidad a una

herramienta de mejoramiento. La aplicación de mutágenos puede incrementar la frecuencia de mutaciones y permite al mejorador usarlas dentro de ciertos límites. (Rodríguez-Garay & Barrow, 1992).

La primera limitación para la aplicación de mutágenos, es impuesta por el genoma pre-existente. Una limitante adicional de ésta técnica es que los mutágenos que se utilizan actualmente no pueden ser dirigidos a un gen específico. Los mutágenos afectan la estructura molecular del ADN, pero muchos de estos cambios inducidos pueden ser reparados antes de que se manifiesten como mutación (mutaciones génicas, translocaciones y otras aberraciones cromosómicas), (Santana *et al.*, 1996; Morela *et al.*, 2002; Florido *et al.*, 2002).

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro*, han permitido la recuperación de mutaciones ocurridas en células somáticas, cuando éstas son sometidas a la acción de agentes mutagénicos, tales como radiación y sustancias químicas. Esto se debe a que el cambio ocurrido en una célula puede ser expresado en todas las células del organismo, cuando ésta es capaz de regenerar una planta vía embriogénesis somática. En "caña de azúcar", se han evaluado los cambios ocurridos por mutágenos en plantas regeneradas a partir de callos por variación somaclonal (Anzidei & Bennici, 2000).

En los últimos 20 años, se han desarrollado investigaciones que conllevan a evaluar el efecto de diferentes fitohormonas en la inducción de callos en gramíneas y la posterior regeneración de plántulas de los mismos, así, se ha empleado la auxina 2,4-diclorofenoxiacético en concentraciones de 13 uM, 22 uM, 30uM; la bencylaminopurina (BAP) a 22 uM, y 30uM; el Ac. indolacético a 10uM, y 20uM,

(Irvine, 1983; Chen, 1988; Taylor, 1992; Larkin, 1993).

La auxina 2,4-Diclorofenoxiacético, (2,4-D), ha sido reconocida, como el regulador de crecimiento más efectivo, para inducir el proceso de inducción de callos somáticos en “caña de azúcar”, así como, la capacidad de generar mutaciones, y en muchas otras familias de plantas superiores, sin embargo, en “caña de azúcar” no todas responden de manera eficiente a la inducción de callos, así tenemos, que al cultivar la variedad venezolana PR-62258 en un medio conteniendo 13 uM del 2,4-D, en oscuridad y a 25° C se obtiene un 70% de callos organogénicos y 30% no organogénicos. Al cultivar las variedades V. 78-1 y V. 75 - 6 en un medio con la misma concentración del 2,4-D los porcentajes de inducción de callos son muy inferiores (Larkin, 1993).

Con la finalidad de inducir mutaciones en “caña de azúcar” (*Saccharum* sp.) se ha empleado la técnica del cultivo de callos generando una variabilidad génica denominada variación somatoclinal. Esta puede ser generada e incrementada por varios ciclos de subcultivos de los callos por períodos largos de tiempo y mediante selección *in vitro*. Esta variación ocurre debido a mutaciones puntuales, rearrreglos cromosomales, mutaciones del ADN y elementos transposables. Se ha demostrado que la diferenciación de tejido de callo de “caña de azúcar” ocurre a partir de células individuales; por lo que, desde el punto de vista de la inducción de mutaciones, esto representa una ventaja, ya que permite la recuperación de mutantes completos y no tejidos quiméricos como usualmente ocurre cuando se aplican agentes mutagénicos a propágulos vegetativos (Santana *et al.*, 1992; Jain., 2001).

El uso de agentes mutagénicos en

cultivos *in vitro* tiende a aumentar la tasa de mutación por encima de la variación somaclonal observada sólo en cultivo de tejidos. Así, estos agentes pueden ser físicos como: fotoperiodos, rayos gamma, rayos “X”, temperatura, químicos como metanosulfonato, azida de sodio, bromonaftaleno, 2,4-diclorofenoxiacético. Este último agente químico (2,4-D), a concentraciones de 2 a 10 mg/L., es capaz de generar variación génica en “papa” (*Solanum tuberosum*), “arroz” (*Oryza sativa*), “sorgo” (*Sorghum bicolor*), “trigo” (*Triticum aestivum*. L), “caña de azúcar” (*Saccharum officinarum* L) (Gutiérrez *et al.*, 2002; Morela *et al.*, 2002); (Portieles *et al.*, 2003).

Los efectos que sufren las células vegetales por los agentes físicos y químicos, aplicados en los medios de cultivo *in vitro*, pueden ser de un amplio espectro, tal como la generación de ruptura de cromosomas, deleciones, adiciones, translocaciones, duplicación de cromosomas, que de alguna manera generan un cambio genético en la célula, que puede ser expresado o quedar como una mutación silenciosa. Las variaciones genéticas generadas en las células, actualmente se les puede identificar empleando técnicas moleculares tales como: reacción en cadena de la RNA-polimerasa, (PCR), polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, (RFLP), polimorfismos de número variable de repeticiones en tandem (VNTR), de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), secuencias simples repetidas (SSRs), o polimorfismos en tandem cortos repetidos (STRs), a nivel de ADN y de proteínas, electroforesis en gel de poliacrilamida, (Figuroa & Shugurensky, 2002; Francia *et al.*, 2001; Shugurensky & Diaz. 2001; Altube *et al.*, 2003; Riscos *et al.*, 2003; Arancibia *et al.*, 2006).

Una herramienta útil para obtener

información acerca de la identidad de las plantas es la utilización de marcadores moleculares, como las isoenzimas (peroxidadas, esterasas, fosfatasas, entre otros) El análisis de isoenzimas en diferentes etapas del cultivo *in vitro* puede ayudar a develar los cambios fisiológicos o bioquímicos subyacentes al proceso de diferenciación y su aplicación como marcadores de ciertas rutas de regeneración *in vitro* de gran utilidad. Muchos son los trabajos realizados donde se han establecido patrones iso enzimáticos característicos asociados con un estado de diferenciación, tales como en "maíz" (*Zea mays*), "cebada" (*Hordeum vulgare* L.), "café" (*Coffea arabica* L.), "tomate" (*Solanum lycopersicum*), "mango" (*Mangifera indica* L.), "arroz" (*Oryza sativa*), "pitajaya amarilla" (*Acanthocereus pitajaya*). (Waldron *et al.*, 2008).

Basándonos en todos los antecedentes encontrados sobre mejoramiento de plantas de carácter agroindustrial, mediante la técnica de cultivo de callos *in vitro*, cultivados en medios conteniendo sustancias mutagénicas y la identificación correspondiente del efecto mutagénico mediante el análisis de marcadores moleculares, se planteó el siguiente proyecto de investigación, empleando para ello como planta de estudio la "caña de azúcar" (*Saccharum officinarum* L.) de las variedades H.32-8560, H. 50-7209 y H.57-5174, plantas que en la actualidad las empresas azucareras poco las están tomando en cuenta para la producción de azúcar, prefiriendo importar variedades de Colombia y Venezuela, por presentar características agronómicas no deseadas para estas empresas agroindustriales.

Materiales y métodos

En el presente trabajo, se emplearon las

variedades H.32- 8560, H.50-7209 y H.57-5174 de "caña de azúcar", provenientes de la Empresa Agroindustrial de Chiquitoy-Trujillo-Libertad-Perú.

Generación de brotes: Se tomaron segmentos de tallos (25 cm) de las variedades en estudio los cuales se les sometió a lavado con agua corriente a una temperatura de 60° C, y fueron colocados en depósitos con agua para inducir la formación de brotes.

Obtención del explante: Logrado los brotes de los tallos se tomaron segmentos de 5 a 10 cm de longitud a partir de la base los que fueron sometidos a un proceso de desinfección con alcohol al 70% por 2 min. Luego se enjuagó con agua destilada estéril por tres veces consecutivas y se lavó con hipoclorito de sodio al 2,5% por 15 min. y finalmente se procedió a enjuagar como en el paso anterior, (Nomberto & Mercado, 1999).

Toma y siembra de la muestra: De los explantes debidamente desinfectados se procedió a obtener pequeños discos de aproximadamente 0,3 cm de espesor dentro de una placa petry y con escalpelo debidamente esterilizados. Estos pequeños discos son sembrados en los medios correspondientes. Todo este proceso y al anterior se realizó tomando todas las precauciones de asepsia dentro de la cámara de siembra.

Preparación de los medios de cultivo: Los tres medios que se prepararon, fueron formulados en base a las sales de Murashige-Skoog (1962), suplementados con sustancias orgánicas además del 2,4-D constituyéndose en los medios "A", "B" y "C" para cada una de las variedades en estudio, (Murashige & Skoog, 1962). Los medios preparados fueron repartidos en alícuotas de 8 ml en tubos de ensayo, se sellaron con papel de aluminio y esterilizados a calor húmedo en autoclave a

121° C, a una Atm., 15 Lb. de presión por 15 min. al término del cual se guardó hasta el momento de la respectiva siembra.

Condiciones de incubación: Colocados los explantes dentro de los tubos conteniendo los medios estériles se pusieron a incubación entre 28 y 30° C., un fotoperiodo lux/oscuridad (16/08 Hrs.) y una radiación de 1,500 lux con luz blanca de fluorescentes de 30 W. (Nomberto & Mercado, 1999).

Extracción de las peroxidasas: Los extractos crudos se prepararon a partir de muestras de: a) callos organogénicos de color verde o marrón oscuro y aspecto mucilaginoso, compactos y provistos de yemas caulinares las cuales fueron removidas antes de tomar la muestra. Las muestras se homogenizaron a 4° C en mortero con buffer Tris/HCl 0,1M Ph= 6,8 + 2% de glicerol + 1% de beta-mercaptoetanol + 1% de azul de bromofenol; en relación 0,1 g. peso fresco/mL. Los homogenizados se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos y se conservan a baja temperatura, (0° C). (Soto *et al.*, 2003).

Identificación de las isoenzimas: La variación genética ocasionada por el mutagénico (2,4-D) se identificó empleando electroforesis en gel de poliacrilamida en un buffer discontinuo adaptado para una electroforesis vertical en placa. La electroforesis se llevó a cabo según Akhtar, (1988) Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT) Colombia

Resultados

Los resultados obtenidos, en lo que se refiere a la acción del 2,4-D en la inducción de callos, se pueden observar en la Tabla N° 1, en donde se presenta el porcentaje de callos formados en cada una de las repeticiones en los diferentes medios a los

cuales fueron expuestas las variedades en estudio. Así, la formación de callos se inicia entre la sexta y séptima semana de sembrado los explantes, siendo la Var. H.32-8560, cultivada en el Medio "A" "B" la que mostró callos con características propias de callos organogénicos.

Los callos obtenidos en los explantes de las variedades H.50-7209 y H.57-5174 en el mismo tiempo, presentaron las mismas características de callos organogénicos. Sin embargo, podemos observar que el porcentaje obtenido en el medio "A" en la var. H.50-7290 es igual al porcentaje en la variedad H.32-8560 en medio "B". Del mismo modo, se puede apreciar, que con el medio "C" ambas variedades presentan un porcentaje bajo en el medio "C". Analizando los resultados de formación de callos en la var. 57-5174, observamos, que los porcentajes en los tres medios empleados son muy bajos con respecto a los resultados en las otras dos variedades empleadas, sin que éstos no presenten las mismas características organogénicas.

Las muestras para la electroforesis fueron tomadas de los callos generados con el Medio "A" para las tres variedades en estudio, por presentar las mejores características organogénicas. Mediante la electroforesis, se determinó la acción mutagénica del 2,4-D en los explantes sembrados de las var. H.32. 8560, H.50-7209 y H.57-5174. El análisis de los zimogramas (Fig. 1), indica la presencia de los diferentes perfiles de las isoenzimas de peroxidasas que presentan las muestras con o sin tratamiento.

El análisis de los zimogramas para peroxidasas (PRX), reveló que la variedad H.32-8560 (1) presenta CINCO bandas y esta misma variedad (2) sin tratamiento posee SIETE bandas. En la variedad H.50-

Tabla 1. Porcentajes de formación de callos en explantes de *Saccharum officinarum* L. var. H.32-8560, H.50-7209 y H.57-5174 a las seis semanas de cultivo.

Repeticiones	Nº de explantes	M			E			D			I			O			S			
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
1	50	70	30	05	40	30	10	22	10	09										
2	50	75	40	07	30	25	08	16	15	07										
3	50	80	35	04	35	32	06	15	07	08										
	150	75	35	5,3	35	29	08	17,6	10,6	08										

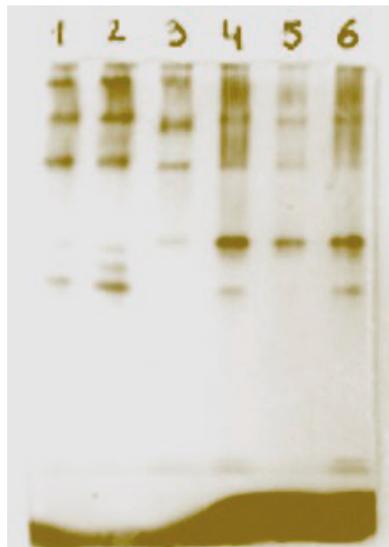


Fig. 1: Electroforesis de peroxidadas de tres variedades de “caña de azúcar” (*Saccharum officinarum* L.) H.32-8560; H.50-7209 y H.57-5174 sujetas a la acción del 2,4-D.

7209 con tratamiento (3) se revela CUATRO bandas, mientras que sin tratamiento (4) presenta CINCO bandas. Asimismo, la variedad H.57-5174 con tratamiento (5) posee CINCO bandas y sin tratamiento (6) posee seis bandas.

Los patrones (zimogramas) de las muestras se confeccionaron dando el

número 1 a la banda más lenta. Se calcularon los rf como el valor de la migración de cada banda con relación al frente del corrido electroforético.

Discusión

Según la Tabla Nº 1 se aprecia que los explantes de las variedades en estudio, sembrados en el medio “A” suplementado

Tabla 2. Valores de rf correspondiente a las bandas electroforéticas de peroxidadas, de tres variedades de “caña de azúcar” *S. officinarum* L. tratadas y no tratadas con 2,4-D.

(C. T.) Sujeta a tratamiento con el 2,4 D.

(S. T.) Sin tratamiento con el 2,4 D.

Var.H.32.8650		Var. H.50-7212		Var.H.57-5174	
(C. T)	(S. T.)	(C. T.)	(S.T.)	(C.T)	(S.T.)
0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,9	0,9	0,9	1,5	1,5	1,5
1,0	1,9	2,2	1,5	2,0	1,9
2,6	2,5	3,8	3,7	2,6	3,5
4,9	3,9	---	4,9	3,7	3,7
---	4,4	---	---	---	4,6
---	4,9				

con 10uM de 2,4-D, tienden a generar callos en un porcentaje de 75 %, 35 % y 17,6% en cada una de las variedades en estudio, así mismo, en relación a la respuesta al 2,4-D, en concentraciones de 20uM, se aprecia que el porcentaje de callos formados en la variedad H.32-8560 coincide con la variedad H.50-7209. Este efecto inductor de callos por el 2,4 D es coincidente con trabajos realizados en otras plantas tales como “trigo”, “papa”, “cebolla”, “palto” y en especial en “caña de azúcar”, evidenciando su capacidad de inducir proliferación celular, tal como lo demuestran los trabajos realizados por Gandonow *et al.* (2005). Sin embargo, la respuesta con el medio conteniendo 30uM del 2,4-D, en las tres variedades en estudio, es de 5,3%, 085% y 08% respectivamente. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Larkin & Scowcraft, (1981) al trabajar con “arroz”, “papa” y plantas forrajeras en altas concentraciones de 2,4-D.

Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron que el 2,4-D tiene efecto estimulante en la formación de callos en el tejido foliar de “caña de azúcar” con características organogénicas. Estos resultados son coincidentes a los obtenidos

por Marcano, (2002) en variedades venezolanas V. 78-1 y V. 75-6, cuando emplea 2,4-D en concentraciones de 22,5 uM obteniendo callos con características organogénicas en un porcentaje de 10% y 30%, muy similares a los logros en el presente trabajo al emplear 20 uM de 2,4-D en las variedades H.32-8560 y H.50-7209. Al emplear 31,5 uM del 2,4-D en las variedades venezolanas encontró, que la inducción de callos está entre 30% y 50%, porcentaje que difiere con los obtenidos en el presente trabajo, los cuales se encuentran entre el 08% y 10% en las tres variedades en estudio. Está demostrado que el 2,4-D genera mutaciones génicas y cromosómicas, que son causa en muchas plantas de que no se produzca rediferenciación celular (Federico, 2005; Larki, 1993).

Consideramos, que los resultados obtenidos pueden haber sido influenciados por factores extrínsecos, tales como, la temperatura, tipo de radiación, fotoperíodo; asimismo, por el trauma sufrido al momento de la extracción del explante factores entrínicos, se pueden considerar el padrón genético de los clones utilizados en el presente trabajo son descendentes

de unos pocos clones ancestrales o de fundación como también se les denomina (Deren, 1995)

Muchos investigadores han identificado clones de azúcar por electroforesis de isoenzimas, pero no existen evidencias que relacionen la estabilidad genética de la planta obtenida por micropropagación y la donante (Waldron *et al.*, 1971; Felmann, 1985).

Del análisis del zimograma de peroxidadas en nuestro trabajo podemos observar, que se revelaron bandas comunes, para las tres especies en estudio, así como también, bandas diferentes dentro de las especies con tratamiento y las sin tratamiento del modo siguiente: CINCO bandas para la var. H.32-8650 con tratamiento y SIETE bandas sin tratamiento; CUATRO bandas para la var. H.50- 7209 con tratamiento y SEIS sin tratamiento y en la var. H.57-5174, CINCO bandas con tratamiento y SEIS sin tratamiento. Schugurensky & Díaz (2001), trabajando en variación somatoclonal con subcultivos de callos (10 ciclos), la var. RA.87-2 obtuvo SIETE bandas, semejante a la var. H.32.8650 sin tratamiento; con la var. LCP-85-376 revela CINCO bandas semejante a la var. H.32-8650 con tratamiento así como en la var. H.50-7209 sin tratamiento y a la var. H.57-5174 con tratamiento. Al emplear la var. LCP.85-384 reveló CUATRO bandas semejantes a las obtenidas en la var.H.50-7209 con tratamiento. Estos resultados, revelan que ambas técnicas tienden a producir el mismo efecto en las variedades estudiadas en ambos trabajos; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el 2,4-D pueda haber generado mutaciones de otros tipos y a otros niveles de las células (Heing & Mee, 1971; Irvin *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1995).

Analizando los rf. de las bandas de

nuestro zimograma con los rf de los zimogramas de peroxidadas en *Persea americana* Mill ("Palto") var. *mejicana* y duke-7 obtenidos por Figueroa & Shugurensky (2002), para la identificación de porta injertos y empleando la técnica de identificación de isoenzimas por electroforesis, observamos que la var. *mejicana* presenta NUEVE bandas de las cuales UNA de ellas presenta un rf de 2,6 semejante a las que presentan la var. H.32-8560 y la var. H.57-5174 con tratamiento y otra banda de rf 3,9 que semejante a la revelada en la var.H.32-8560 sin tratamiento. Asimismo, la var. duke-7 presenta UNA banda de un rf = 1,9 , semejante a la que presenta la var. H.32-8560 y la var. H.57-5174 con tratamiento (Figueroa & chugurensky, 2002).

Las peroxidadas son codificadas por una familia compleja de genes. En las angiospermas se agrupan en pequeñas familias, destacando cat-1 y cat-2 (codificados en el cromosoma 1 de *Arbidopsis thaliana*) y cat-3 (en el cromosoma 4). La similitud de los cultivares revelados por la electroforesis de peroxidadas nos permite establecer una relación de proximidad genética entre los cultivares en el presente estudio, con tratamiento como sin esté. Sin embargo, el número de bandas en las vars. H.32-8560 con tratamiento muestra dos bandas menos que la muestra sin tratamiento, este comportamiento se presenta en las otras variedades en estudio. Los hallazgos encontrados por otros investigadores establecen que estas variaciones se deben a efectos de mutaciones múltiples como: fraccionamiento de cromosomas, deleciones, inducciones, mutilaciones, transposiciones, entre otros. que de una u otra manera los locis que codifican las peroxidadas se encuentran afectados (Santana *et al.*, 1992; Jain, 2001).

Conclusiones

El 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D) es una auxina estimulante de la formación de callos en *Saccharum officinarum* L., “caña de azúcar”, Las variedades en estudio presentan diferentes sensibilidades a la inducción de formar callos a diferentes concentraciones del 2,4-D. Los zimogramas de las tres variedades en estudio con tratamiento, muestran polimorfismo de peroxidadas diferente al polimorfismo de las variedades con tratamiento. La técnica de electroforesis para isoenzimas permite detectar diferencias entre accesiones. Las variedades H.32-8650 y H.57-5174 sin tratamiento muestran un mayor polimorfismo de peroxidadas.

Literatura citada

- Akhtar, H.; W. Buashuk.** 1988. A practical guide for electrophoretic of isoenzymes and proteins in cassava, field beans and forage legumes. CIAT. Colombia.
- Altube, H.; R. Rivata; M. Ontivara & R. Tahorda.** 2003. Caracterización de variedades de “Almendra” (*Prunus amygdalus* Batsch) mediante el polimorfismo enzimático. ITLA (2003) Vol. 99, Nº 2. 208-213. Argentina.
- Anzidei, U. & A. Vennici.** 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in: *Foeniculum vulgare*. Histologie observation of developing embryogenic callus. Plant cell tissue. 61: 69-79
- Arancibia, H.; M. Delgado; O. Coto & H. Garcia.** 2006. Caracterización molecular de variedades cubanas de “caña de azúcar”, (*Saccharum* spp.) mediante AFLP. Revista Fonotécnica Mexicana. Vol. 29, Nº 001, pp. 19-25.
- Chen, J.; M. Davey & J. Power.** 1988. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. J. Exp. Bot. 39: 251–255.
- Deren, C. W.** 1995. Genetic baza of maize land sugarcane Crop. Sci. 35: 1195–1199.
- Federico, A.; M. Gutiérrez & Oliva-Llaven.** 2005. Selección de genotipos de “caña de azúcar” usando características de cultivo de callos. Agrociencia. 46: 605–611.
- Felman, P.** 1985. Identification varietales de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) par è electrophores d` isozymes. L` Agronomic Tropicale, 40: 124–128.
- Figuerola, M. & A. Schugurensky.** 2002. Identificación de isoenzimas de porta injertos de “palta” (*Persea americana* Mill), Agro. Surv.30 Nº 2 Valdivia. Tucumán. Argentina.
- Florido, M.; M. Alvarez; D. Plana & A. García.** 2002. Patrones electroforéticos de peroxidadas, catalasas, superoxidismutasas y proteínas totales en plantas de “tomate” (*Lycopersicon esculentum* Mill). Sometidos a estrés de temperatura. Cultivos Tropicales, Vol. 23, Nº 1 pg. 45–48.
- Francia, F.; A. Schmidt & M. Fuches.** 2001. Electroforesis de proteínas hidrosolubles e isoenzimas para caracterización de clones de “yuca” (*Manihot esculenta*). Investigadores INIA. Centro Nacional de Investigadores Agropecuarios, Apdo. 4653. Maracay 2101. Aragua. Venezuela.
- Gandonow, Ch.; J. Abrini; M. Idaomar & S. Senhaji.** 2005. Response of sugarcane (*Saccharum* sp) varieties to embryogenic callus induction and in Vitro SALT stress. African Journal of Biotechnology, Vol.4(4) pg. 350–354.
- Gonzales, V.** 1983. El mejoramiento genético de la “caña de azúcar” en Venezuela (1961 – 1981). I. Selección de variedades venezolanas. Caña de azúcar. Venezuela 1(12): 41–56.
- Gutiérrez, A.; F. Santacruz; L. Cabrera & B. Rodríguez.** 2002. Mejoramiento genético de plantas *in vitro*. E. GNOSIS (online) Vol. 1 Art. 4. Guadalajara – México.
- Heinz, D. & G. Mee.** 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. American Journal of Botany, 58(3): 257–262.
- Hussain, A. & W. Bushuk.** 1988. A practical guide for electrophoretic análisis of isoenzymes and protein in cassava, field beans and forage legumes. Food Science Departamen University of Manitota Winnipeg, Manitota- Canada.
- Irvine, J.; M. Fitch & P. More.** 1983. The induction of callus in sugarcane tissue cultures by selected chemical. Plant cell. Tiss. Org. Cult. 2: 141–149.
- Irvin, J.; T. Benda; L. Legendre & R. Machado.** 1991. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerate from callus culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 26: 115–125.
- Jain, J.** 2001. Tissue culture-derived variation in crop

- improvement. *Euphytica* 118 (2): 153–166.
- Larking, P. & W. Scowcraft.** 1993. Somaclonal variation a novel improvement. En: *Genetic Engineering of plant*. T. Kosugge, C. P. Merdit, A. Hollacenter / Edit) New Cork, pg. 289–314.
- Lat, J. & M. Landin.** 1993. Agronomic performance of sugarcane clones derived from callus tissue. *Phillips, J. Crop. Sci.* 1: 117–123.
- Marcano, A.; P. Molina, M. Oropeza & E. García.** 2002. Optimización del proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de “caña de azúcar”. *Acta Científica Venezolana*, 55: 251–257.
- Morel, F.; V. González; S. Castroni & E. Díaz.** 2002. Efecto de la radiación gamma sobre la diferenciación de planta de caña de “azúcar” a partir de callos. *Agronomía Trop.* Vol.52 (3) : .
- Murashige, T. & F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco culture. *Physiol Plant* 15: 473 – 495.
- Nomberto, C. & D. Mercado.** 1999.- Regeneración de plantas de “caña de azúcar” (*Saccharum officinarum* L.) a través del cultivo de callos *in vitro* Lab. de Biotecnología Vegetal. Fac. Ciencias Biológicas. UNT. Trujillo-Perú.
- Portieles, R.; R. Rodríguez & M. Cornide.** 2003. Cytogenetic characterization of new clones of the *Saccharum complex*. *Revista.Cultivos Tropicales*, 3:21 (1)
- Riscos, J.; J. Victoria & F. Angel.** 2003. Diversidad genética de “caña de azúcar” (*Saccharum spp.*) usando marcadores moleculares. Laboratorio de Biotecnología CINECAÑA A.A. 9138 Cali – Colombia. E. mail: fangel@cinecana.org.
- Rodríguez-Garay, B. & J. Barrow.** 1992. La biotecnología vegetal en el mejoramiento genético, En: Álvarez de la Cuadra J. J. *Biotecnología hoy*. CONACYT – CIA. TEJ. A. C. pg.157–172.
- Santana, I.; O. Nodarse; A. Díaz & R. Blanco.** 1992. Selección de subclones resiste al “virus del mosaico” de la “caña de azúcar” (SCMV) a partir de la variedad C. 236-51. “Caña de azúcar”. 10(2): 71–78. La Habana – Cuba.
- Santana, I.; O. Nodarse; A. Arencibia & A. Rodríguez.** 1996. Utilización del alfa bromonaftaleno en la inducción de mutaciones en cultivos de tejidos de “caña de azúcar”. *Caña de Azúcar*. Vol. 14(1) 3–14.
- Schurenrensky, A. & L. Díaz.** 2001. Identificación de clones micropropagados de “caña de azúcar” (*Saccharum* sp.) por electroforesis de isoenzimas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* Vol. 18: 176–186.
- Soto, M.; M. Faloci & M. Medina.** 2005. Expresión diferencial de beta esterases y peroxidadas en callos organogénicos y no organogénicos de *Arachis pintoi* obtenidos *in vitro*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Corrientes – Argentina.*
- Taylor, W.; H. Ko; S. Adkins & R. Rathus.** 1992. Establishment of embryogenia callus and high protoplas yielding suspension cultures of sugarcane, (*Saccharum* sp. Hybrids). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 28: 69–78.
- Taylor, W.; J. Geijskes; O. Oko; A. Fraser & R. Henry.** 1995. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA. análisis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. 90 (1) : 169–173.
- Waldron, J. & K. Glaziou.** 1971. Isozymes method of varietal identification in Sugarcane. *Proc. ISSCT.* 14: 249–256.

