

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE EL USO DE MARCADORES RAPD EN *IPOMOEA*: UNA ALTERNATIVA PARA LA CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

O.S. González Paneque, A. Fernández, Y. Fraga, B. Pino, M.M. Hernández Espinosa, J.J. Silva Pupo, Á. Espinosa Reyes y J. Pérez Pérez

- 1 CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS. UNIVERSIDAD DE GRANMA. APDO. 21. BAYAMO. CP: 85100. GRANMA. CUBA.
- 2 LABORATORIO DE FISIOPATOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA. CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA DE LA HABANA (CENSA). SAN JOSÉ DE LAS LAJAS. LA HABANA. CUBA.
- 3 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MEJORAMIENTO DE LAS PLANTAS. INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS DE LA HABANA (INCA). GAVETA POSTAL 1. SAN JOSÉ DE LAS LAJAS. LA HABANA. CP: 32700. CUBA.
E-MAIL: OGPANEQUE@UDG.CO.CU

RESUMEN

El trabajo se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Cien-

cias Agrícolas, perteneciente a la Universidad de Granma, Cuba; para lo cual, se emplearon raíces tuberosas del clon de boniato (camote) INIVIT B 93-1, trasladadas al laboratorio y colocadas en fras-



cos con agua para inducir la brotación de las yemas, y vitroplantas de embriones somáticos obtenidos de callos a partir de limbos foliares, sembrados en medio MS; y para ambos casos se tomaron al azar muestras de limbos foliares para estudiar la estabilidad del material propagado mediante análisis moleculares del ADN (RAPD), empleando diez cebadores arbitrarios (OPF y OPA), evaluándose las bandas existentes entre el donante y el regenerante por su presencia y ausencia. Es necesario el monitoreo molecular del material vegetal para la conservación de la biodiversidad genética en las diferentes localidades, regiones y países. Como resultado, siete cebadores produjeron una amplificación aceptable en cuanto a la intensidad de bandas en el donante y las vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos, existiendo un alto monomorfismo entre ambos materiales, lo cual puede brindar mayor y más certera información del material vegetal para el establecimiento de estrategias y procedimientos a favor de la conservación y difusión de la biodiversidad.

Palabras clave: ADN, boniato, molecular, RAPD.

ABSTRACT

This work was conducted in the Centre of Studies of Plant Biotechnology of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Granma. We used tuberous roots of the sweet potato clone INIVIT B 93-1 and vitroplants derived from somatic embryos coming from calli obtained from leaf tissue grown in MS medium. Tissue samples from both types of plant material were randomly obtained and their genetic stability analyzed by molecular analysis of the ADN (RAPD), using ten arbitrary primers (OPF y OPA) and evaluating the bands in terms of presence and absence. Such a molecular monitoring is required for any study of genetic diversity conservation to be conducted in different localities, regions and countries. As a result, seven primers produced an acceptable amplification, indicated by the intensity of the bands found in the donor and the somatic embryo-derived vitroplants. The high monomorphism appearing between both materials gives more accurate information for the

establishment of strategies and procedures for the conservation and diffusion of the biodiversity.

Key words: ADN, sweet potato, molecular, RAPD.

INTRODUCCIÓN

El boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) es comúnmente consumido en el mundo y la obtención de material de siembra mediante la micropropagación acelerada representa una alternativa para la producción de “semilla” de alta calidad (LÓPEZ *et al.*, 2002) y el empleo de las técnicas *in vitro* posibilitan resolver esta situación favoreciendo la multiplicación del mismo.

Una vía de multiplicación acelerada de los cultivos es la embriogénesis somática, la que representa un gran avance en el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (MERKLE, PARROT & FLINN, 1995); siendo su aplicación de gran importancia en los cultivos de interés agrícola (FREIRE, 2001), aunque todavía no ha sido señalada para algunas especies (PARROT, 2002). Conjuntamente con ello, se hace necesario la identificación genética del material vegetal, para lo cual se emplean los marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares (CORNIDE *et al.*, 2002). Según FORD-LLYOD (2001), la identificación basada exclusivamente en marcadores morfológicos, no es totalmente satisfactoria debido a su lentitud y de ahí la necesidad del empleo de otros medios como los moleculares (VARGAS *et al.*, 2002).

Los marcadores pueden ser empleados para buscar diferencias en los patrones de expresión entre plantas; lo cual indica que son específicos para cada material genético, siendo una vía que confirma que el método puede ser usado para evaluar las variaciones genéticas en las plantas (RODRÍGUEZ, 2005). De ahí que desde el punto de vista conservacionista, el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* han resultado ser muy útiles para la protección de la flora amenazada y se ha convertido en una alternativa muy eficaz para la conservación de las especies a nivel mundial (SERNA, 1999). Sin embargo, es necesario tener presente la estabilidad y variabilidad del material vegetal para lograr una correcta manipulación y conservación del mismo.

Como una vía segura de identificación y caracterización del material vegetal en los últimos años se han desarrollado y aplicado con éxito las técnicas de los marcadores moleculares para el estudio de poblaciones de plantas posibilitando la conservación de la biodiversidad de las especies vegetales en el planeta. Al ser analizada la identificación de genotipos, específicamente mediante RAPD, podemos plantear que ha sido posible su empleo en varias especies debido a que cada cultivo produce un patrón reproducible de bandas de ADN amplificado (VERA, 1999).

Como parte de los trabajos que se llevan a cabo en el estudio de la diversidad genética en el cultivo del boniato, se desarrolló la presente investigación donde perseguimos como objetivo evaluar, mediante el uso de los marcadores RAPD, la estabilidad genética del material para lograr un adecuado manejo y conservación de los recursos vegetales en esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon plantas provenientes de raíces tuberosas pertenecientes al clon INIVIT B 93-1, cultivadas en parcelas experimentales de investigación, según el Instructivo Técnico del boniato (CUBA. MINAGRI, 1998), trasladadas al laboratorio y colocadas en frascos con agua en condiciones semi-controladas para inducir la brotación de las yemas y vitroplantas (Figura 1) procedentes de embriones

somáticos (Figura 2) obtenidos a partir de callos de limbos foliares de 1 cm² (GONZÁLEZ *et al.*, 2001), sembrados con la superficie adaxial (Figura 3) en contacto con el medio de cultivo propuesto por MURASHIGE & SKOOG (1962); para ambos casos se tomaron los limbos foliares para realizar los análisis moleculares del ADN.

Con la finalidad de evaluar la utilización de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD), para estudiar la estabilidad del material propagado, se tomaron al azar muestras de tejido foliar de brotes de raíces tuberosas con 25 días y vitroplantas con 20 días de edad. Se extrajo el ADN genómico total, según el método descrito por DELLAPORTA, WOODY y HICH (1983). La concentración de ADN de cada muestra fue determinada por espectrofotometría y se estimó la medición a la intensidad óptica de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25 uL que contenía: 10 mM Tris-HCL a pH 8,3; 50 mM KCL, 2 mM MgCL₂, 0,001% de gelatina; 100 uM de cada dNTPs, 5 pmoles de los cebadores Kits OPA y OPF, 5 ng de ADN genómico y 2 U de taq ADN polimerasa (Amplicen).

Se usaron diez cebadores arbitrarios que fueron los siguientes: OPF-15, OPF-14, OPA-13, OPF-13, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPF-03, OPA-12 y OPF-05; los cuales han sido usados con anterioridad para este tipo de estudio en diferentes cultivos por PETEIRA *et al.* (1999 y 2001).

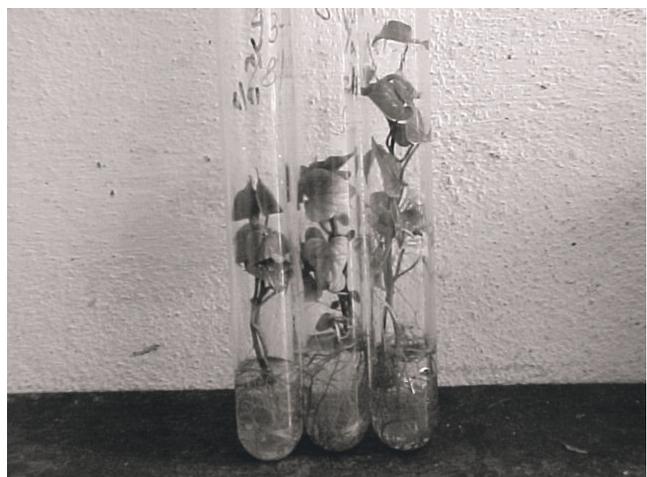


Figura 1. Plantas provenientes de raíces tuberosas y vitroplantas procedentes de embriones somáticos pertenecientes al clon INIVIT B 93-1.

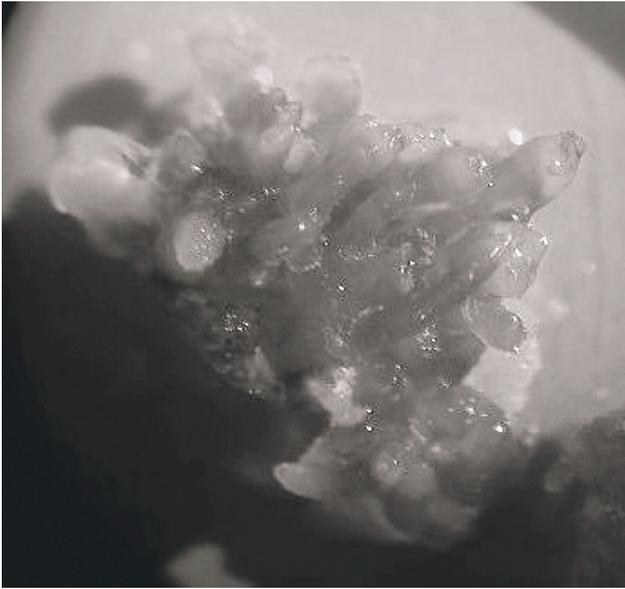


Figura 2. Embriones somáticos obtenidos a partir de callos de limbos foliares.

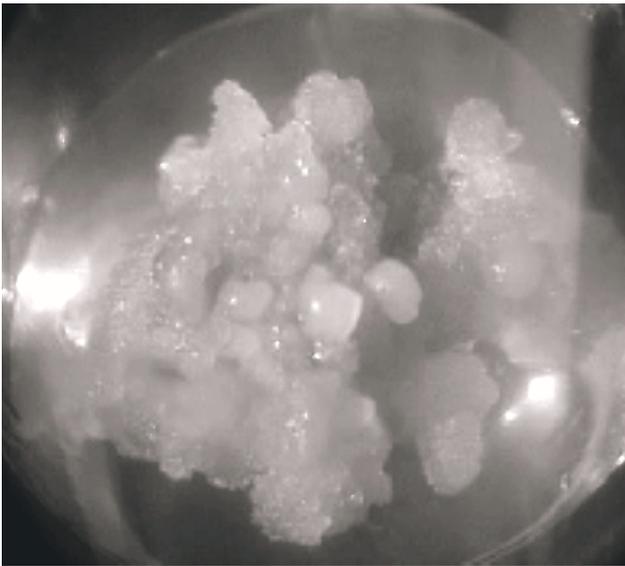


Figura 3. Callos con estructuras embriogénicas obtenidos a partir de limbos foliares.

La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador y la reacción de amplificación se realizó durante 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C, 2 y 10 minutos a 72°C (Peteira *et al.*, 1999). Los productos de la amplificación, separados mediante electroforesis vertical en gel de agarosa al 1,5% en solución amortiguadora de Tris-HCL ácido bórico EDTA (TBE) 0,5X a 110 volts, fueron teñidos con bromuro de etidio (5 mg.mL⁻¹) y visualizados en un transiluminador ultravioleta.

Se evaluaron las bandas existentes en el donante y el regenerante de forma binaria por su presencia (1) y ausencia (0), visualizándose a través de fotografías. Los resultados se expresaron en porcentajes de monomorfismo.

RESULTADOS

Como parte de la necesidad del monitoreo molecular del material vegetal y la conservación de la biodiversidad, se hace necesario llevar a cabo estos trabajos para el estudio de la diversidad genética y la conservación de los recursos genéticos en las diferentes localidades, regiones o países.

De un total de diez cebadores ensayados, siete produjeron una amplificación aceptable en cuanto a la intensidad de bandas (OPF-15, OPF-14, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPA-12 y OPF-05) y los cebadores más informativos fueron el OPF-01, OPA-12 y OPF-07, al generar el mayor número de bandas en el donante y las vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos (Tabla I), coincidiendo el total de bandas obtenidas para el donante y las vitroplantas con todos los cebadores empleados (Figura 4), existiendo un alto monomorfismo entre ambos materiales (100%).

A partir de los resultados obtenidos se puede plantear que la amplificación del ADN de los materiales con los cebadores utilizados, produjo un alto grado de monomorfismo, presentando las plantas procedentes de embriones somáticos patrones de bandas idénticos al donante en la región del ADN explorada por los mismos. Las semejanzas observadas en el ADN genómico de las plantas donante y las vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos evidenciaron que no se observó polimorfismo para los cebadores empleados. Siendo de esperar que, en futuros estudios que se realicen con el empleo de un mayor número de marcadores moleculares, brinden una mayor y más certera información del material vegetal para el establecimiento de estrategias y procedimientos a favor de la conservación y difusión de la biodiversidad, con la seguridad genética de las especies de que se dispone y un mejor uso de las mismas.

La funcionalidad de los cebadores empleados en este trabajo, para detectar variación genética, ha sido

Tabla I. Resultados del análisis de los RAPD en el material donante y el material regenerado a partir de embriones somáticos en el clon INIVIT B 93-1

Cebador	Clon INIVIT B 93-1			
	Total de bandas (n)		Bandas monomórficas	Monomorfismo (%)
	Donante	Regenerado		
OPF-15	4	4	4	100
OPF-14	2	2	2	100
OPA-13	5	5	5	100
OPF-13	1	1	1	100
OPF-04	3	3	3	100
OPF-07	5	5	5	100
OPF-01	6	6	6	100
OPF-03	2	2	2	100
OPA-12	6	6	6	100
OPF-05	6	6	6	100
---	40	40	40	100

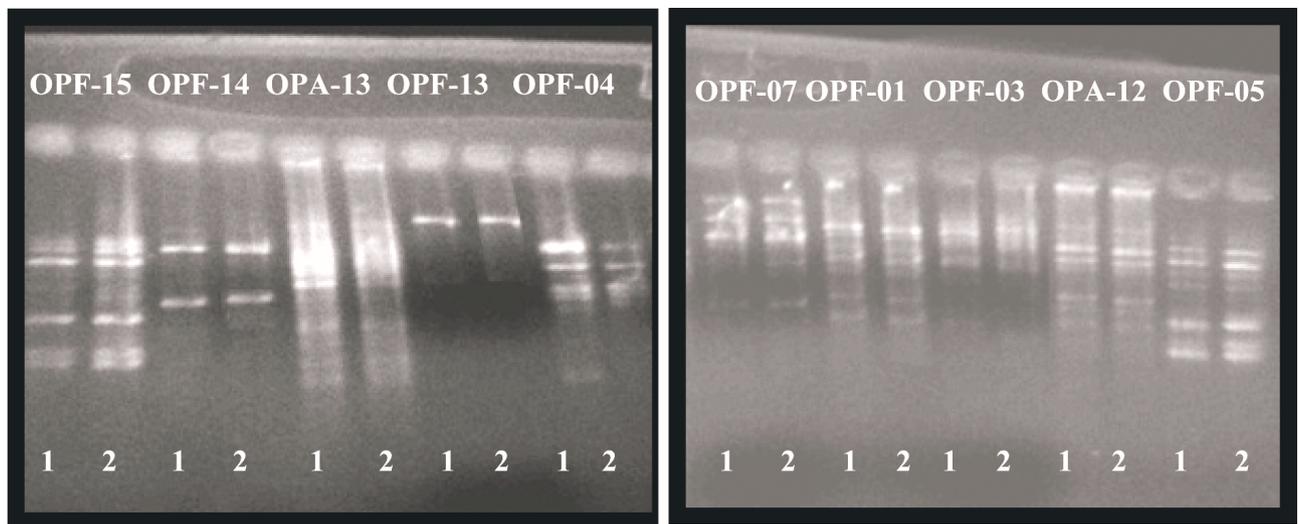


Figura 4. Productos de la amplificación por PCR del ADN en *Ipomoea batatas* 1 – Material donante. 2- Vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos.

informada por PETEIRA *et al.* (1999 y 2001), en estudios de diversidad genética en diferentes especies vegetales del género *Lycopersicon*, quienes demostraron que los mismos son efectivos para llevar a cabo

estos estudios y no han sido señalados con anterioridad para el cultivo del boniato, por lo que deberán probarse otros cebadores antes de hacer conclusivos los resultados de monomorfismo encontrados para el



donante y las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1.

DISCUSIÓN

Referente al empleo de los marcadores moleculares, diferentes autores como Ramírez (2005), plantearon que son una herramienta eficaz para monitorear la estabilidad genética del material vegetal, y por otra parte (RODRÍGUEZ & ARENCIBIA, 2002; COTO & CORNIDE, 2002), dejaron claro que los mismos brindan más información que los marcadores morfológicos, pues el polimorfismo detectado es mayor y no están influenciados por el ambiente. Estas investigaciones son necesarias para poder identificar el comportamiento y los cambios que se llevan a cabo en el material vegetal en la naturaleza y los mismos no pueden ser observados de inmediato y a simple vista, trayendo consigo otras consecuencias en la biodiversidad vegetal; de igual manera, se puede conocer el impacto que ocasiona el cambio climático actual y la actividad del hombre en la naturaleza, posibilitando el establecimiento de patrones moleculares de estricta observación y respeto para el estudio de la biodiversidad.

Por otra parte, las investigaciones de los marcadores moleculares, permiten conocer de las especies identificadas la información que las mismas ofrecen de su composición molecular específica, de su trayectoria genética, características y actividad; todo lo cual puede ser empleado para futuros estudios, ofreciendo posibles caminos a soluciones básicas de la conservación y estudio de la biodiversidad; a pesar de que los momentos actuales no permiten disponer de las técnicas moleculares en todos los laboratorios y áreas de conservación de la biodiversidad, si se considera una importante solución para el estudio de los problemas que existen actualmente de las pérdidas de la biodiversidad y las necesidades de su protección urgente.

Los RAPD han sido usados extensamente para determinar la diversidad genética y relaciones entre especies (IPEK & IPEK, 2003; BAMBERG & DEL RIO, 2003). En el cultivo del boniato, los estudios moleculares con el empleo de RAPD han sido usados específicamente en algunos cultivares para la estima-

ción de la diversidad genética, en el mapeo genético de los clones de interés y la localización de genes en las raíces resistentes a nemátodos (TSENG et al., 2001), no existiendo información en lo referente a estudios llevados a cabo en el material propagado vía embriogénesis somática.

Al respecto SÁNCHEZ *et al.* (2003), plantearon que los análisis de RAPD pueden ser usados para la identificación de cultivares; además, para distinguir diferencias entre genotipos.

Desde el punto de vista molecular, el cultivo del boniato ha sido poco investigado, aspecto que se hace necesario enfatizar, ya que según GONZÁLEZ (2003), la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales requieren como análisis complementarios los estudios de la estabilidad genética del material obtenido. A partir de estos resultados se logra un mayor entendimiento de la necesidad de efectuar estudios moleculares del ADN en el material vegetal, para alcanzar una mayor riqueza y seguridad en las especies a conservar, proteger y extender en los diferentes ecosistemas, garantizando la protección de los mismos.

Los estudios a nivel molecular tienen especial relevancia en los momentos actuales, donde se ejecutan trabajos de selección acelerada y mejoramiento genético a los que están sometidos la mayoría de los cultivos aprovechando el uso de las modernas tecnologías en los cultivos agrícolas; todo ello permite evaluar la aparición de nuevas variedades y su comparación con las ya existentes, lo que permitirá el aumento de la biodiversidad del material genético.

El estudio de los recursos genéticos a nivel molecular se hacen cada día más necesarios para controlar y evitar la pérdida de la biodiversidad; todo lo cual pone en peligro la disponibilidad de alimentos a nivel mundial y con ello la conservación de las especies de interés para el hombre con la mayor calidad y cantidad posible. En este sentido, el empleo de las técnicas moleculares, resulta de gran utilidad e importancia en la elaboración de futuros protocolos de investigación y producción a gran escala de material vegetal genéticamente conocido y a favor de la diversidad vegetal con una función protectora y evaluadora de los posibles cambios presentados por la contaminación ambiental y la acción del hombre.

Los resultados obtenidos servirán de base a otros estudios y permitirán evaluar, controlar y trazar estrategias para la conservación y uso de los recursos genéticos, todo lo cual se traduce en la conservación de la biodiversidad vegetal y con ello la vida en el planeta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a los miembros del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana (INCA), específicamente al Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, especialmente a la Dra.C. Martha Álvarez Gil, el MSc. Juan Castillo Hernández, la Técnica Mirtha López Machado y el administrador Técnico Pedro Brito Gaspar. Al Dr.C. Benedicto Martínez Coca, perteneciente al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de La Habana (CENSA). A los investigadores Dr. C. Luis M. González Nuñez y el Dr.C. Ramiro Ramírez, ambos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov”, Provincia de Granma, por las correcciones del documento y la toma de las fotos presentadas en el mismo, respectivamente. A los miembros del Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara, por la facilitación del material vegetal para realizar la investigación. A los miembros del Club de Computación y Electrónica de la ciudad de Manzanillo, Provincia de Granma, especialmente a los directivos del mismo, los MSc. Dionisio Ponce Ruiz y Omar Pérez Lozada, por la facilitación de la tirada final del presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAMBERG, J. & A. DEL RÍO. 2003. Vulnerability of alleles in the us potato gene bank extrapolated from RAPDs. *Amer. J. of Potato Res.* 80: 79-85.
 CORNIDE, M. T., J. SÁNCHEZ & D. CALVO. 2002. Identificación de genotipos y progenitores. En: M. T. Cornide (ed), *Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*. Capítulo 7. La Habana. Pp. 212-220.
 COTO, O. & M. T. CORNIDE. 2002. Principales aplicaciones de los marcadores moleculares. En: M. T. Cornide (ed), *Marcadores Moleculares*.

Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Capítulo 4. La Habana. Pp. 92-119.
 CUBA. MINAGRI. 1998. Instructivo técnico sobre el cultivo del boniato. SEDAGRI/AGRINFOR. La Habana. 21 pp.
 DELLAPORTA, L., J. WOODY & J. HICH. 1983. A plant molecular DNA minipreparation. Versión II. *Plant Mol. Biol.* 1: 19-21.
 FORD-LLYOD, B. 2001. Genotyping in plant genetic resources. *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plant*. CAB International. 56 pp.
 FREIRE, M. 2001. Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) Híbrido var. C 87-51, empleando medios de cultivo líquidos. *Jornada XXXV Aniversario del INIVIT*, Santo Domingo, Villa Clara. 56 pp.
 GONZÁLEZ, M. E. 2003. Micropropagación de cafeto (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 97 pp.
 GONZÁLEZ, O., J. SILVA, A. ESPINOSA, E. OLIVA & I. MILANES. 2001. Efecto de la iluminación en la inducción de callos morfogénicos en boniato. *Bioteología Vegetal* 1(2): 89-92.
 IPEK, M. & A. IPEK. 2003. Comparing of AFLPs, RAPD markers, and isoenzymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(2): 246-252.
 LÓPEZ, J., M. TORRES, C. BORROTO, R. TRUJILLO, M. DAQUINTA, R. GÓMEZ, M. GARCÍA, V. MEDERO, J. VENTURA, N. MONTANO, A. MORALES, M. CABRERA, A. ROBAINA, A. RAYAS, & C. PONS. 2002. Metodología para la propagación *in vitro* del boniato. *Jornada XXXV Aniversario del INIVIT*, Santo Domingo, Villa Clara. 18 pp.
 MERKLE, S., W. PARROT & B. FLINN. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: T. A. Thorpe (ed), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Klumer Academic Publishers. Pp. 155-203.



- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantar* 15: 473-497.
- PARROT, W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. Conferencia. *VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara. Pp. 7-17.
- PETEIRA, B., B. FERNÁNDEZ, P. GARCÍA, E. MIRANDA, O. LEON & I. MIRANDA. 1999. Repetibilidad de los marcadores RAPD en el género *Lycopersicon*. Breve estudio. *Protección Vegetal* 14(2): 75-79.
- PETEIRA, B., E. FERNÁNDEZ, M. GONZÁLEZ, T. SHAGARODSKY & I. MIRANDA. 2001. Aplicación de marcadores RAPD al estudio de la diversidad genética en Cuba. *Protección Vegetal* 16(2-3): 84-91.
- RAMÍREZ, R. 2005. Uso de bajas dosis de rayos x en la estimulación del crecimiento, rendimiento y calidad del fruto en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. Pp. 99.
- RODRÍGUEZ, M. & A. ARENCIBIA. 2002. Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas Analíticas. En: M. T. Cornide (ed), *Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*. Capítulo 1, Pp. 13-35.
- SÁNCHEZ, M., M. MARTÍNEZ, S. VALLADARES, E. FERRO & A. VIEITEZ. 2003. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J. Plant Physiology* 160: 699-707.
- SERNA, M. D. 1999. Biotecnología vegetal y coservación. *Cuadernos de Biodiversidad*. Universidad de Alicante, España. 2:9-11.
- TSENG, Y., H. LO & S. HWANG. 2001. Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphism. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 43: 99-104.
- VARGAS, D., A. ROQUE & E. HECTOR. 2002. Empleo de la técnica AFLP para determinar la estabilidad de plantas de frutabomba (*C. papaya* cv. Maradol rojo) durante la micropropagación. *VIII Congreso Científico del INCA. Cultivos Tropicales*, La Habana. Pp. 24.
- VERA, CL., M. PAREDES & V. BECERRA. 1999. Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimas y RAPDs dentro y entre clases comerciales de Frijol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica* 59(4): 247-259.