

# EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE VITROPLANTAS DE *Rubus glaucus* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES (RAPD)

## ASSESSING GENETIC STABILITY OF *IN VITRO* PLANTS OF *Rubus glaucus* USING MOLECULAR MARKERS (RAPD)

Marta Leonor Marulanda<sup>1</sup> y María del Pilar Márquez<sup>1</sup>

### Resumen

Se obtuvieron plantas de *Rubus glaucus* mediante regeneración *in vitro* de yemas con sales minerales de Murashige y Skoog (1962) suplementadas con tiamina 0.4 mg.l<sup>-1</sup>, cisteína 100 mg.l<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, ácido ascórbico 100 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup> y phytigel 2.7 g.l<sup>-1</sup>, y como reguladores de crecimiento bencil adenina (BA) 1.5 mg.l<sup>-1</sup> y ácido giberélico 1.5 mg.l<sup>-1</sup>. Se evaluó la estabilidad genética de las plantas micropropagadas durante diferentes etapas del cultivo *in vitro*, mediante el uso de marcadores moleculares tipo RAPD. En total se obtuvieron dieciocho bandas que corresponden a 16.44 kb analizadas del genoma. Tres bandas resultaron polimórficas en algunas plantas del subcultivo F<sub>15</sub> y en plantas en condiciones de vivero. El análisis de similitud reveló una alta homogeneidad de las plantas obtenidas por organogénesis a través de callo y de las plantas en los subcultivos F<sub>1</sub>, F<sub>15</sub> y P<sub>1</sub>, P<sub>13</sub>, Pv del proceso de multiplicación *in vitro*.

**Palabras clave:** *Rubus glaucus*, estabilidad genética, marcadores moleculares, RAPD.

### Abstract

*Rubus glaucus* plants were obtained through *in vitro* regeneration of buds with Murashige and Skoog (1962) mineral salts supplemented with thiamine 0.4 mg.l<sup>-1</sup>, cysteine 100 mg.l<sup>-1</sup>, myo-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, ascorbic acid 100 mg.l<sup>-1</sup>, sucrose 30 g.l<sup>-1</sup>, phytigel 2.7 g.l<sup>-1</sup>, and growth regulators bencil adenin (BA) 1.5 mg.l<sup>-1</sup> and giberelic acid 1.5 mg.l<sup>-1</sup>. The genetic stability of the micropropagated plants was evaluated during different stages of the *in vitro* culture using RAPD molecular markers. Eighteen bands were obtained, which correspond to 16.44 kb analyzed from the genome, three bands were polymorphic in some plants from the F<sub>15</sub> subculture and in greenhouse plants. The similarity analysis revealed a high homogeneity of the plants obtained through callus organogenesis and plants on subcultures F<sub>1</sub>, F<sub>15</sub> and P<sub>1</sub>, P<sub>13</sub>, Pv.

**Key words:** *Rubus glaucus*, genetic stability, molecular markers, RAPD.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos es ampliamente utilizado para la propagación masiva de plantas en muchas especies. Algunas veces las plantas regeneradas difieren del material original. Este fenómeno de variabilidad genética no seleccionado en una población de plantas propagadas *in vitro* se conoce como variación somaclonal y ha sido descrito en muchas especies vegetales (Larkin y Scowcroft, 1981).. La formación de callo y el posterior desarrollo de ye-

mas adventicias a partir de fragmentos de hoja en contacto con el medio de cultivo puede producir un impacto negativo en la obtención de plantas genéticamente iguales a las originales (Hoepfner *et al.*, 1996).

En la producción comercial de plantas *in vitro* se conocen los problemas de inestabilidad genética del material propagado debido al número de subcul-

Recibido: noviembre de 2001; aprobado para publicación: febrero de 2002.

<sup>1</sup> Profesora, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia. E-mail: ubioteve@andromeda.utp.edu.co.

vos o a las concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados para la propagación (Henry, 1997). La naturaleza de la variación somaclonal ha sido descrita por varios autores y se refiere a translocación de cromosomas, cambios en el número cromosómico y movilización de elementos trasponibles, entre otros aspectos, como los posibles cambios que ocurren en plantas regeneradas *in vitro* y sus progenies (Cloutier y Landry, 1994).

El monitoreo de las vitroplantas mediante marcadores moleculares puede ser un método efectivo para evitar la introducción en el campo de genotipos no deseados. Existen marcadores fenotípicos disponibles para este objetivo; sin embargo, los marcadores basados en el ADN son más efectivos y complementarios a los caracteres morfológicos, debido a que no son afectados por el ambiente o el desarrollo de las plantas (Newbury y Ford-Lloyd, 1993).

Entre los diferentes marcadores moleculares conocidos, los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) son útiles para el desarrollo de huellas digitales de ADN cuando se requiere identificar variedades dentro de una especie, determinar el parentesco de un material de mejoramiento y caracterizar y clasificar el material clonal obtenido por el cultivo *in vitro* (Karp *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares son en la actualidad herramientas utilizadas para detectar variación somaclonal en procesos de producción de plantas *in vitro*, vía embriogénesis somática, como en *Allium sativum* (Zahim *et al.*, 1999) y *Carya illinoensis* (Vendrame *et al.*, 1999).

Los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados en la caracterización molecular de la diversidad genética presente en el género *Rubus*, como los realizados por Parent y Fortin (1993), Graham y McNicol (1995), Graham *et al.* (1997a y 1997b), Parent y Page (1998) y Marulanda y Márquez (2001).

Es importante aplicar la tecnología de marcadores moleculares para garantizar la estabilidad genética de plantas de mora producidas *in vitro* y la calidad genética de los clones propagados, debido a que esta técnica permite tener un seguimiento a lo largo de los subcultivos hasta la adaptación del material en

vivero, con el fin de certificar la calidad de las plantas que se entregan al cultivador.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para evaluar la estabilidad genética de las plantas micropropagadas de mora, mediante la utilización de marcadores moleculares RAPD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Micropropagación.** Para la multiplicación *in vitro* de mora se utilizaron las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) suplementadas con tiamina 0.4 mg.l<sup>-1</sup>, cisteína 100 mg.l<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, ácido ascórbico 100 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup> y phytagel 2.7 g.l<sup>-1</sup>, y como reguladores de crecimiento bencil adenin (BA) 1.5 mg.l<sup>-1</sup> y ácido giberélico 1.5 mg.l<sup>-1</sup> (Marulanda *et al.*, 2000).

Para el estudio de estabilidad genética del material propagado *in vitro* se analizaron las plantas mantenidas *in vitro* en dos etapas (subcultivos) del proceso de micropropagación: plantas mantenidas en el invernadero de la procedencia Pácora (Caldas), y plantas obtenidas por organogénesis a partir de callo, de la procedencia Filandia (Quindío). Las plántulas usadas para la extracción del ADN fueron tomadas de vitroplantas en proceso de micropropagación de subcultivos 1 y 15 del genotipo Filandia. Se colectaron plántulas de los subcultivos 1 y 13 del genotipo Pácora; y como control se tomaron muestras de plántulas de vivero en ambos genotipos. Las plántulas fueron colectadas en nitrógeno líquido y llevadas al laboratorio para la extracción del ADN.

**Extracción de ADN.** Se utilizaron los métodos de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, con algunas modificaciones, 1983; Gonzales *et al.*, 1995) y el reactivo DNAzol® (Chomezynski *et al.*, 1997). Los ADN se visualizaron en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. La cuantificación de la concentración del ADN de cada clon de mora se calculó mediante fluorometría usando el fluorómetro TKO 100 Hoefer®.

**Análisis RAPD.** Para el análisis RAPD se escogieron ocho iniciadores sintetizados por Operon Technologies (Alameda, California), reportados en

trabajos anteriores como polimórficos en evaluaciones de la diversidad genética del género *Rubus* (Graham y McNicol, 1995; Graham *et al.*, 1997a y 1997b; Marulanda y Márquez, 2001). Las bandas de ADN se interpretaron en una matriz binaria de presencia-ausencia. Las estimaciones de similitud se calcularon con el método de Nei y Li (1979). El análisis cluster se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma utilizando el paquete estadístico Ntsys-pc versión 2.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la estabilidad genética de las plantas de mora micropropagadas de los genotipos Filandia y Pácora, en distintas etapas de la propagación *in vitro* ( $F_{15}$  y  $P_{13}$ ), obtenidas mediante la organogénesis a partir de callo ( $F_0$ ) y plantas mantenidas en condiciones de invernadero ( $F_v$ ,  $P_v$ ), se realizó con ocho iniciadores (tabla 1) que produjeron entre una y cinco bandas por iniciador, con un rango de tamaño entre 11.501 y 0.805 kb. Los iniciadores seleccionados produjeron dieciocho bandas, tres de las cuales resultaron polimórficas, lo cual representa 16% de polimorfismo. La frecuencia de variación molecular por genotipos fue 0.16 para Filandia y 0.11 para Pácora (tabla 2).

Con el iniciador *Rubus* 05 se obtuvieron dos bandas polimórficas para dos individuos ( $F_{v1}$  y  $F_{v2}$ ) (figura 1a) de las plantas mantenidas en invernadero; con el iniciador *Rubus* 07 se obtuvo una banda polimórfica para dos individuos  $F_v$  y dos individuos  $F_{15}$  (figura 1b). Los demás individuos mostraron patrones de bandeo iguales con los iniciadores probados.

En el análisis cluster del grupo formado por individuos del genotipo Filandia se observan siete plantas con un coeficiente de similitud de 1.0. Los demás individuos  $F_{15}$  se agruparon con tres de los individuos  $F_v$  y uno  $F_0$  a un coeficiente de similitud de 0.94, y dos individuos  $F_v$  muestran un coeficiente de 0.83 (figura 2). Los datos anteriores revelan una alta homogeneidad de las plantas obtenidas por organogénesis a través de callo y de las plantas en los subcultivos  $F_4$  y  $F_{15}$  del proceso de multiplicación *in vitro*. Se detectó variación en algunas plantas del subcultivo  $F_{15}$  y en plantas en condiciones de vivero.

Algunos individuos del genotipo Pácora ( $P_1$  y  $P_v$ ) mostraron dos bandas polimórficas con el iniciador *Rubus* 05 (bandas D y E) (figura 1a). Con el iniciador *Rubus* 07 se observa una banda polimórfica (A) en individuos del subcultivo 13 (figura 1b). El aná-

**Tabla 1.** Iniciadores utilizados para la evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus*

Iniciador	Secuencia	Nº de bandas totales	Nº de bandas polimórficas
<i>Rubus</i> 01	GGTCCTCAGG	2	-
<i>Rubus</i> 05	AGCCAGCGAA	5	2
<i>Rubus</i> 06	AATCGGGCTG	2	-
<i>Rubus</i> 07	CCACCGCCAG	4	1
<i>Rubus</i> 13	TCGGAGTGGC	2	-
<i>Musa</i> 06	GTCCTGGATG	1	-
<i>Musa</i> 07	GTGCGTATGG	1	-
OPP 12	AAGGGCGAGT	1	-

**Tabla 2.** Estimación de la frecuencia de variación molecular por genotipo, en plantas micropropagadas de *Rubus glaucus*

Nº de plantas evaluadas /genotipo	Genotipos	Nº total de bandas	Bandas polimórficas	Frecuencia de polimorfismos
18	Filandia	18	3	0.16
13	Pácora	18	2	0.11

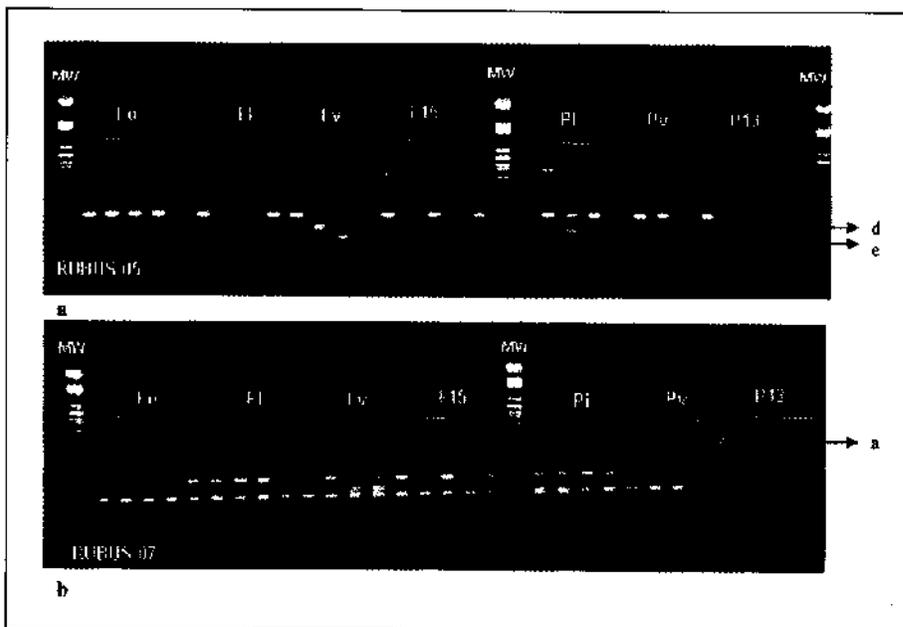


Figura 1. a. Marcadores RAPD obtenidos con el iniciador *Rubus 05*. b. Marcadores obtenidos con el iniciador *Rubus 07*

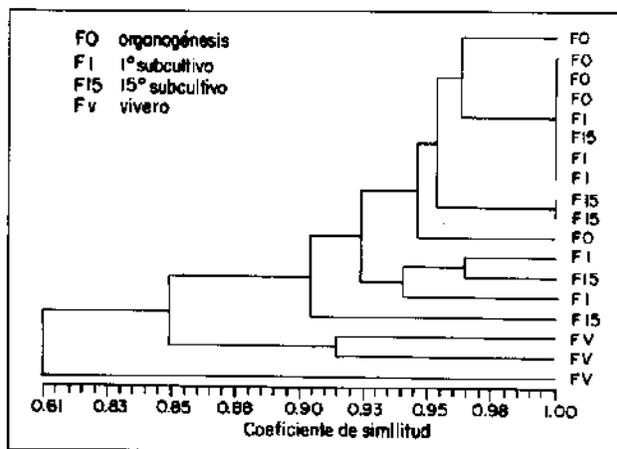


Figura 2. Análisis de similitud en vitroplantas del genotipo Filandia

lisis cluster revela una alta homogeneidad del material del genotipo Pácora propagado *in vitro*, con un coeficiente de similitud de 0.8 (figura 3).

En total se obtuvieron dieciocho bandas, correspondientes a 16.44 kb analizadas del genoma total que tiene un tamaño de 280 Mpb (Arumuganathan y Earle, 1991). Este cálculo se hizo con base en el número de fragmentos amplificados y sus tamaños. Dado el tamaño del genoma de *Rubus* (280 Mpb), se estima que el análisis realizado en este estudio

cubre 0.057% del genoma. Aunque la porción del genoma estudiado es muy pequeña, el análisis RAPD tiene el potencial de una cobertura al azar de todo el genoma, debido a la utilización de iniciadores muy polimórficos, como lo demostraron Graham y McNicol (1995), Graham *et al.* (1997a y 1997b), y tal como se evidenció en un análisis de diversidad genética de los cultivares de mora utilizados para la micropropagación (Marulanda y Már-

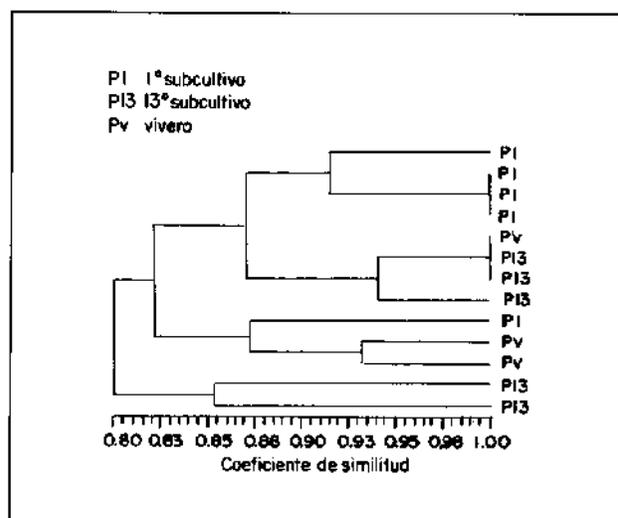


Figura 3. Análisis de similitud en vitroplantas del genotipo Pácora

quez, 2001), donde los mismos iniciadores produjeron 82.6% de polimorfismo frente a 16% obtenido en el análisis de estabilidad. Cambios en el ADN que producen mutaciones puntuales, como sustitución de bases, deleciones e inserciones cortas, no resultan en polimorfismos detectables a menos que éstos ocurran en la región de apareamiento de los iniciadores (Taylor *et al.*, 1995).

El polimorfismo de tres bandas, encontrado en el análisis de la estabilidad genética, de las plantas mantenidas en condiciones de vivero, no se vio reflejado en ninguna medida en su fenotipo; no se detectó ninguna planta aberrante después de producir *in vitro* y sembrar en vivero 100.000 plantas. En otros trabajos de estabilidad de plantas de *Rubus* propagadas *in vitro* no se ha encontrado variación somaclonal. Hoepfner *et al.* (1993) no encontraron plantas variantes en un programa de multiplicación *in vitro* de yemas terminales de red raspberry, y Gebhardt *et al.* (1993) tampoco encontraron variaciones morfológicas en evaluaciones de campo de raspberries propagadas por meristemas. Sin embargo, sí se conocen ejemplos de variación en *Rubus* por efecto del cultivo *in vitro*, como lo reportan Swartz *et al.* (1983), que encontraron una planta aberrante (0.05%) en una población de blackberries propagadas por meristemas. Por su parte, Hoepfner *et al.* (1996) encontraron variación somaclonal en la especie *R. idaeus* asociada a la concentración de reguladores de crecimiento en la obtención de yemas adventicias a partir de segmentos de hojas.

La variación genética detectada en este trabajo podría deberse a una variación en el patrón de metilación del ADN, tal como lo describen Angel *et al.* (1996). La metilación como causa de los cambios en los perfiles de ADN por estrés inducido durante el cultivo de tejidos *in vitro*, efecto hormonal y desbalances en los nucleótidos, ha sido descrita por Brown (1989) y Kaeppler y Philips (1993). Brown *et al.* (1991) encontraron altos niveles de metilación en plantas de maíz regenerados por cultivos de tejidos. Mueller *et al.* (1990) también los encontraron en plantas de arroz obtenidos a partir de callo, y Harding (1994) reportó metilación en plantas de papa recuperadas después de conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento.

Otros autores, como Angel *et al.* (1996), no encontraron variación en los perfiles de ADN de plantas de yuca después de conservación *in vitro* durante diez años en condiciones de crecimiento lento. A su vez, Hoepfner *et al.* (1996) describen los cambios ocurridos en el ADN que no inciden en el fenotipo de plantas después del cultivo *in vitro*, como desviación genética. Estos cambios ocurridos en los genes algunas veces no pueden ser observados a nivel morfológico y fisiológico, debido a que las diferencias estructurales en los genes no necesariamente alteran su actividad biológica, de tal manera que resulte o se refleje en genotipos alterados. Estas mutaciones silenciosas a nivel morfológico o fisiológico son importantes porque permiten estimar la frecuencia de los cambios genómicos como resultado del cultivo *in vitro*.

El aumento en la frecuencia de aparición de variantes somaclonales ha sido relacionado con la multiplicación de los explantes durante muchos ciclos de propagación. Se recomienda renovar los explantes cada cierto número de multiplicaciones o después de obtener una determinada cantidad de plantas, con el fin de minimizar los riesgos de variación genética en el material propagado (Orellana, 1998). Establecer el número de subcultivos y el número de plantas obtenidas a partir de cada yema está muy relacionado con cada especie, clon o variedad, por lo que se debe definir este aspecto para cada caso.

## CONCLUSIONES

El análisis RAPD de la estabilidad genética de las vitroplantas de mora mostró tres bandas polimórficas de un total de dieciocho bandas obtenidas con ocho iniciadores, lo que sugiere que el método de propagación masiva de *Rubus* por cultivo de tejidos *in vitro* no induce cambios genéticos significativos que incidan en las características fenotípicas de las plantas. Con base en estos resultados, se recomienda emplear los marcadores RAPD para estudiar la estabilidad genética durante la micropropagación masiva de *R. glaucus* y efectuar hasta diez subcultivos de multiplicación *in vitro*, sin peligro de introducir variación somaclonal de acuerdo al fenotipo.

## AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación de la investigación; a Corpoica Caldas; al convenio UTP-GTZ y a

la Universidad Tecnológica de Pereira por el apoyo institucional.

## REFERENCIAS

- Angel F, Barney VE, Tohme J, Roca W. 1996. Stability of *cassava* plants at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. *Euphytica* 90:307-313.
- Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208-218.
- Brown PTH. 1989. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome* 31:717-729.
- Brown PTA, Gobel E, Lorz H. 1991. RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants. *Theor Appl Genet* 81:227-232.
- Chomezynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. 1997. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* 22:550-553.
- Cloutier S, Landry B. 1994. Molecular markers applied to plant tissue culture. *In vitro Cell Dev Bio* 30:32-39.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Reporter* 1(14):19-21.
- Gebhardt K, Viola Ehrmantraut U, Schimmelpfeng H. 1983. *In vitro* von Himbeeren: Massenvermehrung und Eignung für den gärtnerischen Anbau. *Mitteilungen Klosterneuburg* 33:24-30.
- Gonzales D, Palacios N, Gallego G, Thome J. 1995. *Protocolos para marcadores moleculares*. Unidad de Investigación de Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali (Colombia). 64 p.
- Graham J, McNicol RJ. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theor Appl Genet* 90(7-8):1.128-1.132.
- Graham J, Iasi L, Millam S. 1997a. Genotype specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48(3):167-173.
- Graham J, Squire GR, Marshall B, Harrison RE. 1997b. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPD markers. *Mol Ecol* 6(11):1.001-1.008.
- Harding K. 1994. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55:141-146.
- Henry RJ. 1997. *Practical applications of plant molecular biology*. Chapman y Hall, Cambridge University Press, Great Britain. 258 p.
- Hoepfner AS, Nybon H, Carlsson U, Franzen R. 1993. DNA fingerprinting useful for monitoring cell line identity in micropropagated raspberries. *Acta Agricult Scandinavica, Sec B, Soil and Plant Science* 43:53-57.
- Hoepfner AS, Nestby R, Nybon H. 1996. Genetic deviation initiated by adventitious shoot regeneration from tissue cultured red raspberry. *J Horticult Sci* 71(7):71-79.
- Kaepler SM, Phillips RC. 1993. DNA methylation and tissue culture induced variation in plants. *In vitro Cell Dev Biol* 29:125-130.
- Karp A, Kresovich S, Ayad VG, Hodgkin T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *Internat Plant Genet Res Inst IPGRI Technical Bulletins # 2*. Italy. 47 p.
- Larkin P, Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197-214.
- Marulanda ML, Carvajalino M, Vento H. 2000. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas élite de *Rubus glaucus*. *Actual Biol* 22(73):121-129.
- Marulanda ML, Márquez MP. 2001. Caracterización de la diversidad genética de *Rubus glaucus* mediante marcadores RAPD. *Actual Biol* 23(74):57-63.
- Mueller E, Brown PTH, Hartke S, Lorz H. 1990. DNA variation in tissue culture derived rice plants. *Theor Appl Genet* 80:673-679.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasa. *Proc Nat Acad Sci* 79:5.267-5.273.
- Newbury HJ, Ford-Lloyd BV. 1993. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regul* 12:43-51.
- Orellana P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: JN Pérez Ponce (eds.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, Cuba.
- Parent JG, Fortin MG. 1993. Identification of raspberry cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Canadian J Plant Sci* 73(4):1.115-1.122.
- Parent JG, Page D. 1998. Identification of raspberry cultivars by sequence characterized amplified region DNA analysis. *Hortscience* 33(1):140-142.
- Swartz HJ, Naess SK, Zheng YP, Cumaragunta J, Luchsinger L, Walsh CS, Stiles H, Turk BA, Fordham I, Zimmerman RH, Fiola JA, Smith B, Popenoe J, Smolarz K, Zmarlicki K. 1993. Maryland/Virginia/New Jersey/Wisconsin *Rubus* breeding program. Sixth international symposium on *Rubus* and Ribes, Skierniewice, Poland, 3-10. *Acta Horticult* 352:485-492.
- Taylor PWJ, Geisjkes JR, Ko HL, Fraser TA, Henry RJ, Birch RG. 1995. Sensitivity of random amplify polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugar cane during tissue culture. *Theor Appl Genet* 90:1.169-1.173.
- Vendrame WA, Kochert G, Wetzstein HY. 1999. Aflp analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports* 18:853-857.
- Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports* 18:473-477.