

Estimación de la variabilidad genética en plantas de Ñame regeneradas por embriogénesis somática.

Estimation of genetic variability in Ñame plants regenerated by somatic embryogenesis

Eder Durango Ballesteros¹, Carlos Durango Ballesteros²

Resumen.

Las plantas regeneradas de cultivos in vitro pueden presentar variaciones somaclonal, las cuales se han descrito en gran diversidad de plantas (Amberger, et al., 1992.; Fourré, et al., 1997; Kuksova, et al., 1997; Yang, et al., 2008; Suliman, et al., 2009; Prado, et al., 2010b; Giorgetti, et al., 2011). Las variaciones somaclonales ocurren con una frecuencia de 1 mutación cada 100 plantas regeneradas, en contraste con la tasa esperada de mutación espontánea de 10^{-7} a 10^{-9} mutaciones por par de nucleótidos por generación. En algunos casos, las variantes somaclonales no han avanzado de la etapa de laboratorio o invernadero, debido probablemente a que el material seleccionado tiene poca importancia práctica, además de la escasa regeneración de plantas en cultivos de largo periodo, siendo algunos de estos somaclones inestables (originados por variación epigenética), presentando alteraciones no deseables como aneuploidía, esterilidad, etc. (Cardone, et al., 2004). Para establecer la variabilidad, se utilizaron plantas madres de campo y 20 plantas regeneradas por embriogénesis somática de dos clones *Dioscorea alata*, a las cuales se les extrajo el ADN, y se amplificó vía RAPD, utilizando 17 juegos de primers de secuencia nucleotídica arbitraria (10 pb) sintetizados por Operon Technologies, de la serie OPA (02, 03, 04, 05, 07, 09, 12, 13) y serie OPB (01, 05). Se puede observar amplificación en un máximo de 15 loci con un promedio de 74 bandas de las cuales el 40,54% fueron bandas monomórficas y 59,46% fueron polimórficas. El polimorfismo que se observó entre distintos individuos consistió en la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado debido a mutaciones en el sitio de reconocimiento del iniciador, deleciones o inserciones, encontrándose que de las 20 plantas muestreadas originadas por embriogénesis somática, 4 presentaron variaciones somaclonales. Las modificaciones observadas con algunos primer se pueden deber a la alteración en los patrones de metilación, posiblemente originados por la relación entre los niveles globales de metilación y el contenido de regulador de crecimiento en el medio de cultivo. Estas modificaciones podrían explicar algunos de los tipos de mutaciones, así como ser la base de los numerosos procesos epigenéticos observados en las plantas regeneradas (Vázquez, 2003). En la mayoría de los casos, las células cultivadas in vitro sufren ciclos de división incontrolados como ocurre en células tumorales; esta condición supone un estrés que puede originar mutaciones, cuyos orígenes no son del todo conocidos.

Palabras claves: Variación Somaclonal, Polimorfismo, Regulador de crecimiento, Embriogenesis Somática, ADN

Abstrac

Plants regenerated from in vitro cultures can present somaclonal variations, which have been described in a great diversity of plants (Amberger, et al., 1992, Fourré, et al., 1997, Kuksova, et al., 1997, Yang, et al., 2008; Suliman, et al., 2009; Prado, et al., 2010b; Giorgetti, et al., 2011). Somaclonal variations occur with a frequency of 1 mutation per 100 regenerated plants, in contrast to the expected spontaneous mutation rate of 10^{-7} to 10^{-9} mutations per pair of nucleotides per generation. In some cases, the somaclonal variants have not advanced from the laboratory or greenhouse stage, probably because the selected material has little practical importance, in addition to the scarce regeneration of plants in long-term crops, some of these being unstable somaclones (originated by epigenetic variation), presenting undesirable alterations such as aneuploidy, sterility, etc. (Cardone, et al., 2004). To establish the variability, field mothers plants and 20 plants regenerated by somatic embryogenesis of two *Dioscorea alata* clones were used, to which they were extracted DNA, and amplified via RAPD, using 17 sets of arbitrary nucleotide sequence primers (10 pb) synthesized by Operon Technologies, from the OPA series (02, 03, 04, 05, 07, 09, 12, 13) and series OPB (01, 05). Amplification can be observed in a maximum of 15 loci with an average of 74 bands of

¹ Centro Agro empresarial y Minero SENA. Cartagena-Bolivar. Investigador SENNOVA, Doctor en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal.

² Complejo Tecnológico Agroindustrial, Pecuario y Turístico SENA. Apartado-Antioquia. Investigador SENNOVA. Magister en Ciencias agronómicas énfasis suelos.

*Autor de correspondencia: edurangob@sena.edu.co



which 40.54% were monomorphic bands and 59.46% were polymorphic. The polymorphism that was observed between different individuals consisted of the presence or absence of amplified DNA fragments due to mutations in the site of recognition of the initiator, deletions or insertions, being that of the 20 sampled plants originated by somatic embryogenesis, 4 presented somaclonal variations. The modifications observed with some primer may be due to the alteration in the methylation patterns, possibly originated by the relationship between the global levels of methylation and the content of growth regulator in the culture medium. These modifications could explain some of the types of mutations, as well as being the basis of the numerous epigenetic processes observed in regenerated plants (Vázquez, 2003). In most cases, cells cultured in vitro undergo uncontrolled division cycles as in tumor cells; this condition supposes a stress that can originate mutations, whose origins are not completely known.

Keywords: Somaclonal variation, polymorphism, growth regulator, somatic embryogenesis, DNA

Introducción.

Las plantas regeneradas de cultivos in vitro pueden presentar variaciones fenotípicas, a menudo hereditarias. Variaciones que se conocen como variación somaclonal, las cuales se han descrito en gran diversidad de plantas derivadas de embriogénesis somática (Amberger, et al., 1992.; Fourré, et al., 1997; Kuksova, et al., 1997; Yang, et al., 2008; Suliman, et al., 2009; Prado, et al., 2010b; Giorgetti, et al., 2011). Las variaciones somaclonales permiten descubrir la variabilidad genética natural y la variabilidad genética que se genera in vitro en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como en plantas regeneradas de los mismos durante la propagación, por el proceso de diferenciación y rediferenciación a que están sometidos las células (Larkin y Scowcroft, 1981), ofreciendo nuevas alternativas para el mejoramiento genético vegetal, ya que puede producir características agronómicas deseables (Maluszynsky, et al., 1995).

La variación somaclonal ocurre con una frecuencia de 1 mutación cada 100 plantas regeneradas, en contraste con la tasa esperada de mutación espontánea de 10^{-7} a 10^{-9} mutaciones por par de nucleótidos por generación. En algunos casos, las variantes somaclonales no han avanzado de la etapa de laboratorio o invernadero, debido probablemente a que el material seleccionado tiene poca importancia práctica, además de la escasa regeneración de plantas en cultivos de largo periodo, siendo algunos de estos somaclones inestables (originados por variación epigenética), presentando alteraciones no deseables como aneuploidía, esterilidad, etc. (Cardone, et al., 2004).

Dado que la embriogénesis somática es el sistema de regeneración in vitro más usado, por su alta capacidad de regeneración y por el origen unicelular de los embriones somáticos, lo que garantiza una menor variabilidad genética que en los procesos de organogénesis in vitro, donde el origen de los vástagos o raíces es a partir de estructuras parecidas a meristemos con un compromiso de un gran número

de células para la formación del órgano. Es así como para el mejoramiento de los cultivos, la embriogénesis somática es el sistema más usado y la estimación de la variabilidad genética generada de novo, un paso importante para el sistema establecido. (Levitus, et al., 2010).

Materiales y métodos

Material Vegetal. Se utilizaron plantas madres de campo y regeneradas por embriogénesis somática del clon criollo de ñame Diamante 22, de las cuales se tomaron muestras de hojas para la extracción del ADN.

Extracción del ADN. La extracción del ADN, se realizó de acuerdo con el procedimiento establecido por Doyle y Doyle (1990), modificado por Oropeza, et al. (2006). El ADN extraído fue evaluado, midiéndole la densidad óptica y la integridad con electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Sambrook, et al., 1989). El ADN obtenido se amplificó vía RAPD, utilizando 17 juegos de iniciadores de secuencia nucleotídica arbitraria (10 pb) sintetizados por Operon Technologies, Inc., Alameda CA, USA., serie OPA (02, 03, 04, 05, 07, 09, 12, 13) y serie OPB (01, 05), de acuerdo con el protocolo estandarizado por Ramser, et al. (1997) y utilizando un volumen final de 25 µl conteniendo: Buffer de reacción (1X); MgCl₂ (2 mM); dNTP's (0,2 mM); iniciador (10 pM); ADN de *Dioscorea alata* (100 ng); Taq Polimerasa (0,06 U. por reacción). Los parámetros de amplificación se establecieron de acuerdo con el procedimiento de Ramser, et al. (1997), comprobando la amplificación por electroforesis en gel de agarosa 1,8% y tinción con bromuro de etidio.

Cuantificación del ADN. El ADN extraído se cuantificó por valoración electroforética, comparándolo con concentraciones conocidas de ADN de fago lambda, y por espectrofotometría UV, empleando la relación de lectura de densidad óptica (DO) de 260/280 (Sambrook, et al., 1989), calculando la concentración del ADN asumiendo que la concentración del ADN de 50 µg/ml equivale a una

densidad óptica de 1 a 260 nm (concentración del ADN = $[DO\ 260] \times [\text{factor de dilución}] \times [50\ \mu\text{g ADN}/1\ \text{DO}]$). La relación de 260/280, se consideró como medida de la pureza del ADN el cual permaneció entre 1,76 y 1,91.

Amplificación del ADN. Para la aplicación del análisis, se realizaron amplificaciones al ADN extraído, con oligonucleótidos al azar (RAPDs) a plantas madres y al ADN extraído a 15 plantas seleccionadas al azar, de la población de plantas regeneradas a partir del proceso de embriogénesis somática. El análisis polimórfico de las bandas amplificadas se procesó usando el sistema binario (ausencia de banda = 0 y presencia banda = 1) para la elaboración de la matriz. Con la matriz se calculó el

total de polimorfismos amplificados al dividir la cantidad de bandas polimórficas obtenidas por cada iniciador entre el número total de bandas.

Resultados y Discusiones.

Estimación de la variabilidad genética. El ADN genómico extraído de la planta madre y 20 plantas regeneradas por embriogénesis somática, Se puede observar ausencia de ADN genómico en los Carriles de los geles, 1,2, 8, 9 y 14. Debido a la ausencia de ADN, en los carriles antes mencionados, se evaluaron la variabilidad genética a las muestras de las plantas (planta madre (PM)), 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19 y 20; para un total de 15 plantas regeneradas por embriogénesis somática. (Figura 1)

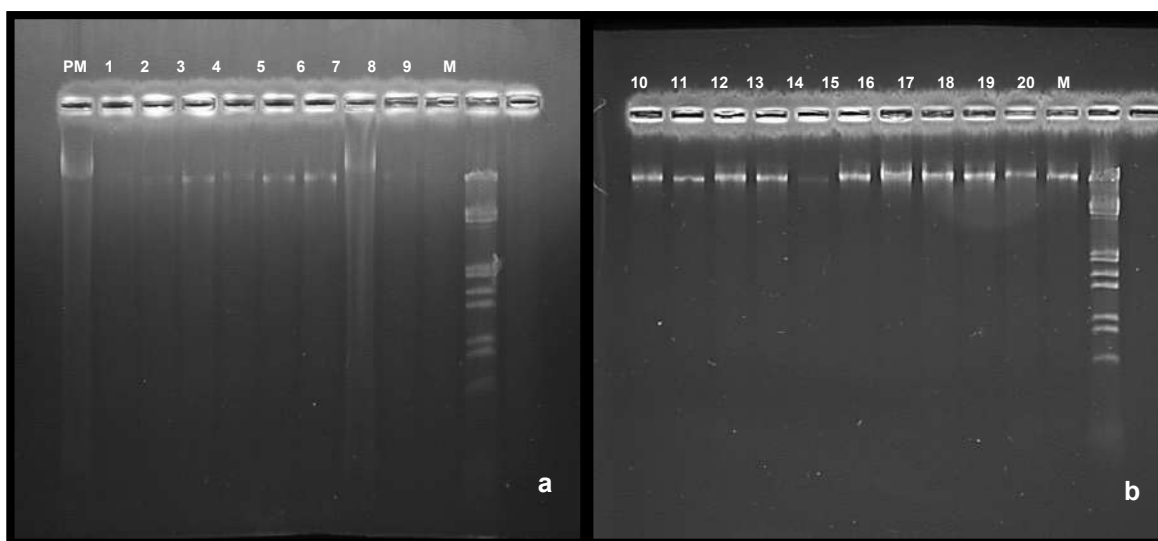


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN genómico de Plantas madre (PM), y carriles del 1 al 20 Plantas regeneradas por embriogénesis somática

Siguiendo el protocolo establecido por Ramser et al. (1997) para las condiciones de ciclado y las concentraciones apropiadas de cada uno de los componentes de la reacción de amplificación, se obtuvieron patrones de amplificación para cada una de las muestras, como se observa en la figura 2, donde se obtuvieron cinco bandas con el OPA02 y siete bandas con OPA03, que van desde los 500 a los 2800 pb. En la Planta 9 se muestra ausencia de la banda de 850pb,

El polimorfismo que se observa entre distintos individuos consiste en la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado debido a

mutaciones en el sitio de reconocimiento del iniciador, deleciones o inserciones. En la amplificación con el iniciador OPA04 y OPA05 (figura 2), se obtuvieron seis y una banda respectivamente, que van desde los 750 a los 2800 pb. Registrándose la ausencia de la banda de 1000 pb en las plantas 2, 3 y 4 y la no amplificación del ADN de la planta 15. De igual forma la amplificación con los iniciadores OPA07 y OPA09, señalen cuatro y cinco bandas respectivamente, que van desde los 500 a los 3000 pb, registrándose igualmente la no amplificación del ADN de la planta 15.

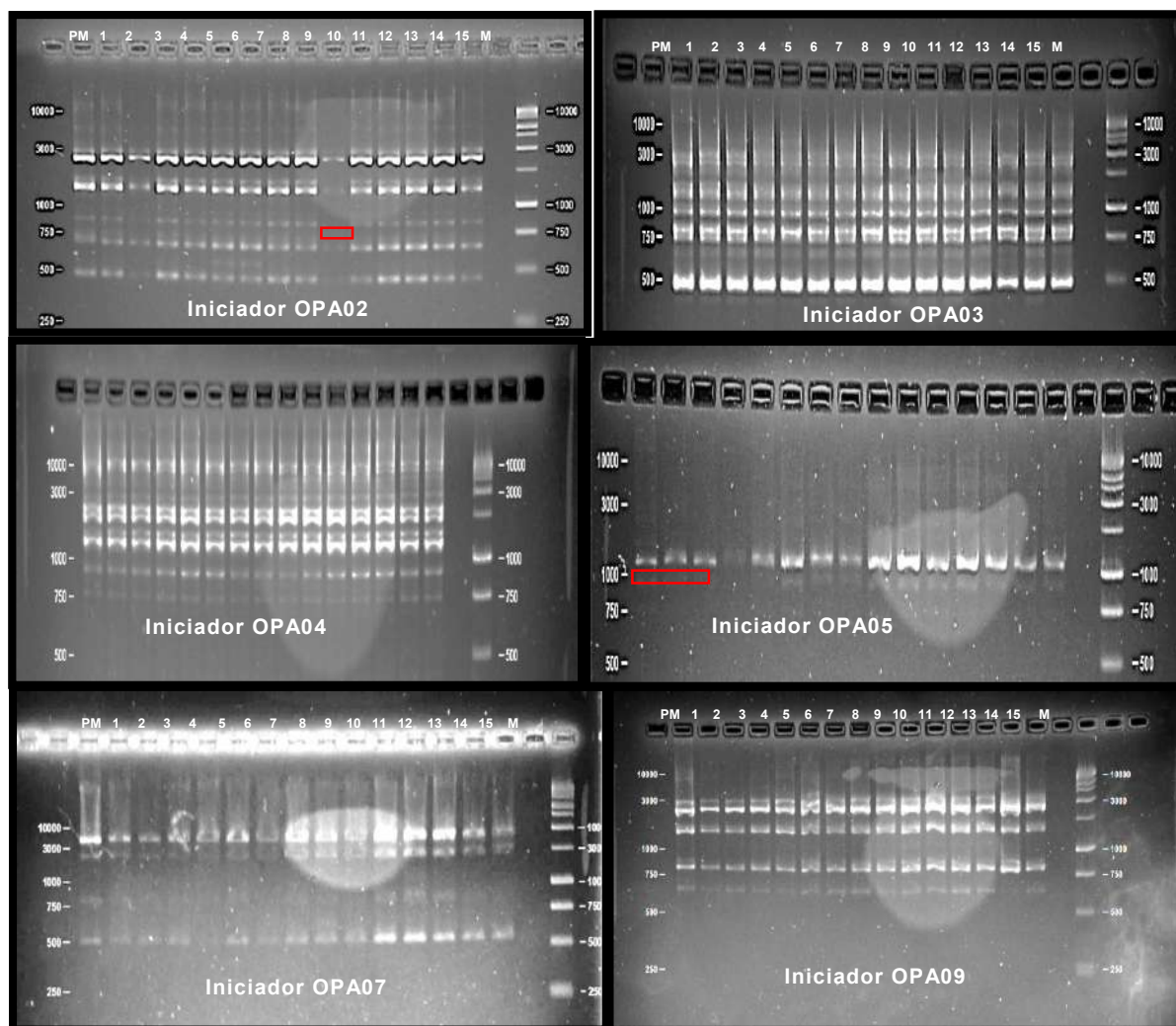


Figura 2. Amplificación RAPDs con el iniciador OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA07 y OPA09 M: Marcador de peso molecular

Las modificaciones observadas con algunos iniciadores se pueden deber a la alteración en los patrones de metilación, posiblemente originados por la relación entre los niveles globales de metilación y el contenido hormonal de los medios de cultivo. Estas modificaciones podrían explicar algunos de los tipos de mutaciones, así como ser la base de los numerosos procesos epigenéticos observados en las plantas regeneradas (Vázquez, 2003).

La variación somaclonal es un evento que puede aparecer durante el cultivo in vitro de tejidos

vegetales, en la mayoría de los casos, las células cultivadas in vitro sufren ciclos de división incontrolados como ocurre en células tumorales; esta condición supone un estrés que puede originar mutaciones, cuyos orígenes no son del todo conocidos. La amplificación con los iniciadores OPA12, OPA13, OPB01 y OPA05 se obtuvieron tres, cinco, seis y dos bandas respectivamente, que van desde los 500 a los 3000 pb. PM: Planta Madre, 1-15: ADN de plantas obtenidas por Embriogénesis Somática, M: Marcador de peso molecular

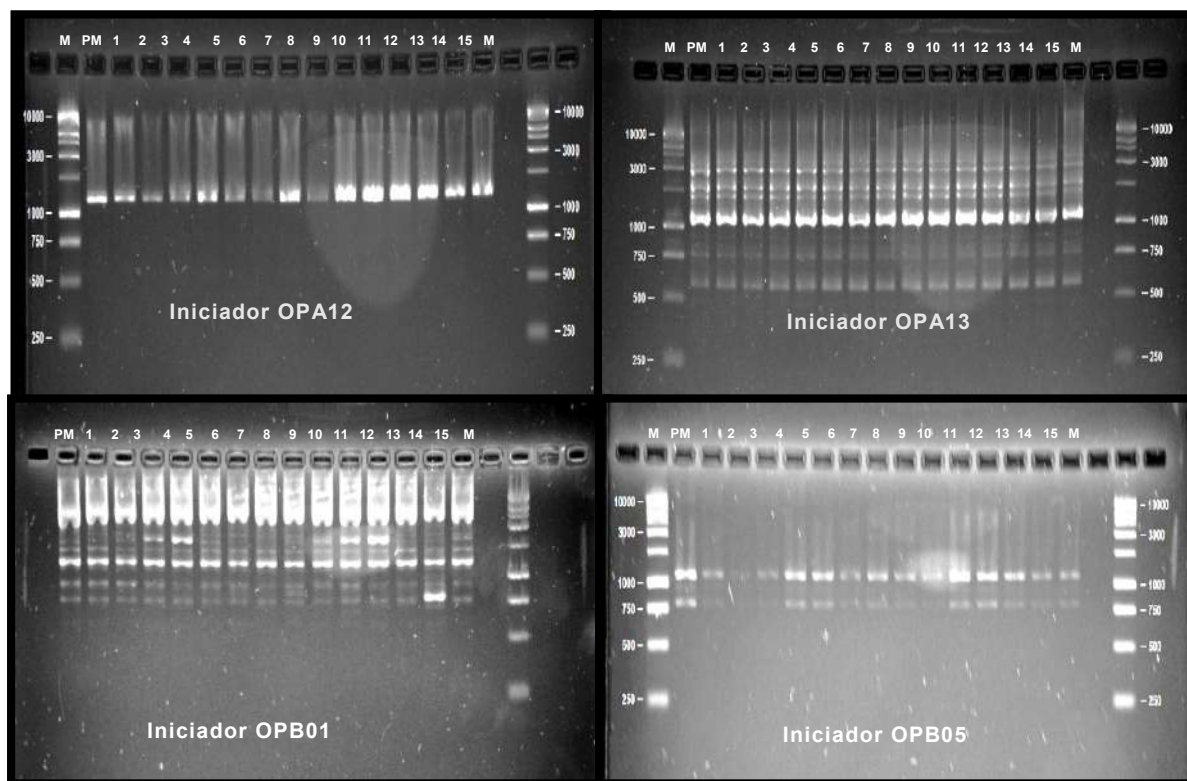


Figura 3. Amplificación RAPDs con el iniciador OPA12, OPA13, OPB01 y OPB05

Los resultados de la amplificación del ADN en las 15 plantas regeneradas por embriogénesis somática, produjeron un total de 659 bandas altamente reproducibles, y un total de 4 bandas polimórficas. El número de bandas generadas por los iniciadores varió de 1 a 7, siendo 3.8 la media; el mínimo de una banda fue generado por el iniciador OPA12, mientras que el máximo número de 7 bandas fue generado por el iniciador OPA03. El tamaño de los productos amplificados varió de 500 a 3000 pb (Tabla 1). El porcentaje de polimorfismos promedio fue de 0,026%, originado por la ausencia de cuatro bandas, una de 850 pb en la planta 9 con el iniciador

OPA02, (Imagen 2) y tres bandas de 1000 pb en las plantas 2, 3 y 4, con el iniciador OPA05 (Imagen 2). El más alto porcentaje de polimorfismos (0,2%) se generó con el iniciador OPA05, y el iniciador OPA02 generó el más bajo porcentaje de polimorfismo (0,06%). Este bajo porcentaje de polimorfismo promedio obtenido, valida el sistema de regeneración de ñame por embriogénesis somática. El empleo de RAPD para estimación de la variabilidad genética en las plantas regeneradas por embriogénesis somática, evidencia que los diez iniciadores, mostraron en su gran mayoría bandas monomórficas.

Tabla 1. Tallas de bandas amplificadas con iniciadores de la serie OPA y OPB

Serie OPA	Secuencia	No Bandas	Tallas (pb) de las bandas amplificadas.
OPA-02	TGCCGAGCTG	5	500,650,900,1700,2800
OPA-03	AGTCAGCCAC	7	500,700,850,950,1500,2500,2800
OPA-04	AATCGGGCTG	6	750, 850,1500,1800,2200,2800
OPA-05	AGGGGTCTTG	2	1000,1200
OPA-07	GAAACGGGTG	4	500,850,2800,7200
OPA-09	GGGTAACGCC	5	650,850,1700,2800,3000
OPA-12	TCGCGCATAG	1	1200
OPA-13	CAGCACCCAC	6	550,750,1200,1800,2200,2800
Serie OPB			
OPB-01	GTTTCGCTCC	6	750,1000,1500,1800,2000,3000
OPB-05	TGCGCCCTTC	2	570,1200



Se pudo observar que la mayoría de las plantas regeneradas muestran el mismo patrón de bandas que el de planta madre. Estos resultados coinciden con trabajos realizados por Marín et al. (2012), en plantas de *D. alata*, procedentes de cultivo *in vitro* (micropropagación y organogénesis), comparándolas con la planta madre (*in vivo*), por la técnica RAPD, donde encontraron un polimorfismo del 0,12%, porcentaje originado por la ausencia de bandas en una planta de 15 analizadas.

Leela et al. (2011), micropropagando 4 accesiones de *Jatropha curcas*, utilizaron 13 Iniciadores para establecer la variabilidad genética generada en la micropropagación de esta especie, encontrando que para todos los iniciadores se estimó una homogeneidad en las plantas micropropagadas no mostrando diferencias con las bandas patrones de la planta madre. Así mismo Dey et al. (2015), utilizando 18 iniciadores arbitrarios en plantas de *Cymbopogon Winterianus* regeneradas por embriogénesis somática, encontraron que 10 iniciadores revelaron polimorfismo que muestra claramente diferentes patrones de bandas, que eran igualmente prominentes en sus diferencias con el control, obteniendo un máximo de entre 11 y 19 bandas polimórficas. Un máximo de 15 loci fueron amplificados con un promedio de 74 bandas de las cuales el 40,54% fueron bandas monomórficas y 59,46% fueron polimórficos.

La variación somaclonal puede ser causada por varios factores, entre ellos, las auxinas como el 2,4-D, el cual favorece la ocurrencia de variantes somaclonales, ya que puede afectar la división celular, provocando mutaciones cromosómicas. La ocurrencia o no de dichas variaciones puede estar influenciada por la concentración de la auxina en el medio de cultivo y el tiempo de exposición del tejido. Las variaciones somaclonales pueden ocurrir de forma espontánea en los tejidos vegetales o ser inducida por el régimen de cultivo *in vitro*; especialmente si las formulaciones del medio de cultivo son potencialmente mutagénicas (Minh y Thi, 2003; Ostry y Ward, 2003; Gati, 2006).

Conclusiones

El análisis molecular con RAPD permite establecer la confiabilidad y reproducibilidad del sistema de regeneración de plantas de ñame, obteniéndose con 10 iniciadores arbitrarios un porcentaje de bandas polimórficas del 0,26%, lo que da validez al sistema de regeneración de ñame por embriogénesis somática indirecta.

Se amplificaron un máximo de 15 loci con un promedio de 74 bandas de las cuales el 40,54% fueron bandas monomórficas y 59,46% fueron polimórficos.

Bibliografía

- Amberger, L.A., Shoemaker, R.C., Palmer, R.G. 1992. Inheritance of two independent isozyme variants in soybean plants derived from tissue culture. *Theor. Appl. Gen.* 84:600- 607.
- Cardone, Susana; Olmos, Sofia; Echenique, Viviana. 2004. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal: Métodos para generar variabilidad*. Ed. INTA: 81-96.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, Vol. 12, No. 1: 13-15.
- Fourré, J.L., Berger, P., Niquet, L., Andre, P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Gen.* 94:159-169.
- Gati, E. 2006. *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas* 7(3):297-301.
- Kuksova V.B., Piven, N.M., Gleba, Y.Y. 1997. Somaclonal variation and *in vitro*



- induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 49:17-27.
- Levitus, G; Echenique V; Rubinstein C; Hopp E; y Mroginski L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ed: INTA. 648p
- Giorgetti L., Rufinni M., Turrini A., Nuti Ronchi V., Geri C. 2011. Cytogenetic and histological approach for early detection of "mantled" somaclonal variants of oil palm regenerated by somatic embryogenesis: first results on the characterization of regeneration system. *Caryologia* 64: 223- 234.
- Maluszynsky M., Ahloowalia B.S., Sigurbjornsson B. 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85:303-315.
- Marín, Erick; Vargas, Teresa Edith; Oropeza, Maira. 2011. Variabilidad genética y anatomía foliar comparada de plantas de *Dioscorea alata* mantenidas en cultivo *in vitro*. *Interciencia*, vol. 37, núm. 6: 477-483.
- Minh, D. y Thi, N. 2003. *In vitro* selection for salt tolerance in rice. *Omonrice* 11: 68-73.
- Oropeza, Maira; Marin, Erik; Royero, Marilyn y Vargas, Teresa. 2006. Establishment of an efficient RAPD protocol for Yam plants. 56(4): 602–605.
- Ostry, M. and Ward, K. 2003. Field performance of *Populus* expressing somaclonal variation in resistance to *Septoria musiva*. *Plant Science* 164:1/8.
- Prado M.J., Rodríguez E., Rey L., González M.V., Santos C., Rey M. 2010b. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 103(1): 49–59.
- Ramser, J., K. Weising, V. Chikaleke and G. KahL. 1997. Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. *BioTechniques*. 23:285-290.
- Sambroock, J. E. F. Fritsh and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition, Vol 3. Cold Spring Harbory Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Suliman Elmeer K.M., Gallagher T.F., Hennerty M.J. 2009. RAPD-based detection of genomic instability in cucumber plants derived from somatic embryogenesis *Afr. J. Biotechnol.* 8(14):3219-3222.
- T. Dey a, S. Saha b, P.D. Ghosh. 2015. Somaclonal variation among somatic embryo derived plants — Evaluation of agronomically important somaclones and detection of genetic changes by RAPD in *Cymbopogon winterianus*. *South African Journal of Botany* 96: 112–121
- T. Leela, B. Naresh, M. Srikanth Reddy, N.Ch. Madhusudhan, Prathibha Devi Cherku. 2011. Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. *Applied Energy* 88: 2071–2079.
- Vázquez, Ana. 2003. Estabilidad genética en cultivos *in vitro*. V Reunión de la sociedad española de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales: 20-22.
- Yang X.M., An L.Z., Xiong Y.C., Zhang J.P., Li Y., Xu S.J. 2008. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and monitoring the genetic fidelity of regenerated plants in grapevine. *Biol. Plant.* 52(2):209-214.