

Determinación por AFLP de la estabilidad genética de plantas de yuca obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis

Víctor R. Medero^{1*}; Roosevelt Escobar²; Gerardo Gallego²; Joe Tohme²; Yoel Beovidez¹; Sergio Rodríguez¹ y Rafael Gómez³. *Autor para correspondencia.

1. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.
2. Unidad de Biotecnología. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
3. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

Se describe el empleo de la técnica de AFLP para determinar a nivel molecular la estabilidad genética de las plantas de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) propagadas por diferentes métodos: embriogénesis somática, organogénesis y tradicional en campo. Se utilizaron los clones CMC-76, CEMSA 74-725 y Señorita del banco de germoplasma del INIVIT. Se aplicaron dos Kit para AFLP, uno con una combinación de cebadores de selección +2/+3 (AFLP® Analysis System II, GibcoBRL®) y otro +3/+3 (AFLP® Analysis System I, GibcoBRL®). Se estudiaron 44 combinaciones de cebadores (*EcoRI*+2 ó *EcoRI*+3 x *MseI*+3) y se seleccionaron cinco como los más eficientes. Se encontró que las plantas procedentes de los diferentes métodos de propagación estudiados dentro de cada clon, resultaron genéticamente idénticas y sólo fueron observadas diferencias entre los tres clones estudiados. Este resultado confirmó la utilidad de los AFLP para el estudio de la estabilidad genética de los materiales micropropagados, conservados a mediano plazo o criopreservados. Además, las plantas obtenidas por estas técnicas pueden ser utilizadas para la producción de material de plantación de alta calidad en este cultivo.

Palabras clave: embriogénesis somática, estabilidad genética, *Manihot esculenta*, organogénesis

ABSTRACT

AFLP techniques have been reported to determine the genetic stability at a molecular level of cassava plants propagated by several methods: somatic embryogenesis, organogenesis and field conditions. 'CMC-76', 'CEMSA 74-725' and 'Señorita' clones from the germplasm collection kept at the INIVIT were used. Two Kit for AFLPs were applied, one of them combined selection primers +2/+3 (AFLP Analysis System II GibcoBRL) and the other +3/+3 (AFLP® Analysis System I, GibcoBRL®). 44 combination primers (*EcoRI* + 2 ó *EcoRI* + 3) were tested and five were selected as the most efficient. Plants derived from different propagation methods within each clone resulted identical genetically and differences were only observed in the three studied clones. This result corroborates the efficiency of AFLPs to study the genetic stability of micropropagated material, stored at medium term or in cryopreservation. Besides, plants obtained with these techniques can be used for the production of high quality planting material in this crop.

Key word: genetic stability, organogenesis, somatic embryogenesis

En yuca (*Manihot esculenta*, Crantz), la obtención de clones con resistencia a plagas y enfermedades, con menor deterioro postcosecha y con mayor calidad nutritiva; así como la producción de material de plantación con alta calidad, constituyen necesidades actuales para los productores. Hacia el alcance de ese objetivo, la biotecnología ofrece nuevas y potentes opciones que pueden contribuir a la mejora genética de los cultivares existentes y de los nuevos obtenidos por diferentes vías (Thro *et al.*, 1998).

La micropropagación es una alternativa de gran utilidad para la producción de "semilla" de alta calidad, la introducción de nuevos cultivares y la sustitución rápida de otros ante problemas fitosanitarios o desastres naturales (Freire, 2001). Sin embargo, el empleo de las técnicas biotecnológicas en plantas puede provocar cambios genéticos, lo cual es necesario detectar antes de que el material se trasplante a condiciones de campo. Además, se conoce que el cultivo de tejidos vegetales, provoca con frecuencia micromutaciones y

aberraciones cromosómicas, que en muchos casos modifican el fenotipo de los individuos resultantes y dan lugar a confusiones en la identificación precisa y definitiva del material obtenido.

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de estimar a nivel molecular la estabilidad genética de las plantas regeneradas por embriogénesis somática y organogénesis para definir su posible utilización en un programa de producción de material de plantación de alta calidad en yuca.

La investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Se utilizaron plantas procedentes de diferentes métodos de propagación: embriogénesis somática, organogénesis y tradicional de los clones CMC-76, CEMSA 74-725 y Señorita del banco de germoplasma del INIVIT (Medero *et al.*, 2000). Para cada clon y método de propagación *in vitro* fueron seleccionadas plantas al azar del primer y segundo ciclo en campo, así como el

material correspondiente a cada uno, pero propagado por la vía tradicional. Al respecto se analizaron las siguientes variantes:

- I. Plantas propagadas por el método tradicional.
- II. Plantas propagadas por organogénesis. Primer ciclo en campo.
- III. Plantas propagadas por organogénesis. Segundo ciclo en campo.
- IV. Plantas propagadas por embriogénesis somática. Primer ciclo en campo.
- V. Plantas propagadas por embriogénesis somática. Segundo ciclo en campo.

Para la extracción del ADN, se utilizó el protocolo propuesto por Dellaporta *et al.* (1983). Se aplicaron dos Kit para polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificadas (AFLPs) (Vos *et al.*, 1995), uno con una combinación de *primers* de selección +2/+3 (AFLP® Analysis System II, GibcoBRL®) y otra +3/+3 (AFLP® Analysis System I, GibcoBRL®). Inicialmente se utilizaron muestras de dos clones para la selección de la combinación de primeros bebedores más efectivas y posteriormente se aplicaron a todas las variantes. Los diferentes pasos para el trabajo se realizaron según las instrucciones del *Manual del Kit*, según el caso. En un gel de acrilamida al 6% y en una cámara vertical para electroforesis, después de desnaturalizadas las muestras con el programa DENATURE por 2 minutos en un termociclador PTC-100™, se corrieron las mismas a 110 voltios y temperatura promedio de 50 °C por 2 horas aproximadamente. La tinción de los geles de acrilamida se realizó con Nitrato de Plata.

Los datos obtenidos se procesaron mediante un análisis de correspondencia múltiple realizado con el Paquete estadístico SAS versión 6.12 (SAS Institute Inc., SAS/STAT® User's Guide version 6.12).

Para cualquier tipo de análisis de múltiples loci, como resultado es deseable obtener un alto número de puntos potencialmente informativos (en este caso bandas de AFLP) por clon, buena resolución, o claridad de las bandas y una cantidad significativa de polimorfismo (Tohme *et al.*, 1996; Roa, 1997). Teniendo en cuenta lo anterior, una comparación de la resolución y el contenido de información de los productos de amplificación de 44 combinaciones de cebadores (*EcoRI*+2 ó *EcoRI*+3 x *MseI*+3), reveló entre 0 y 104 productos de amplificación por muestra analizada, logrando obtener unos patrones más claros que otros. Las combinaciones que emplearon *EcoRI*+2 x *MseI*+3 nucleótidos selectivos, revelaron un mayor número de productos AFLP que las combinaciones *EcoRI*+3 x *MseI*+3. Las combinaciones *EcoRI*+AG x *MseI*+CAT, *EcoRI*+TG x *MseI*+CAA, *EcoRI*+AAC x *MseI*+CTA, *EcoRI*+AAG x *MseI*+CTG y *EcoRI*+ACA x *MseI*+CTG fueron escogidas entre las más informativas y aplicadas a todas las variantes de propagación en los clones estudiados. De forma general, el número de bandas por genotipo y método de propagación estuvo en el rango de 36 y 38 para las primeras combinaciones y entre 20 y 26 para las restantes, lo cual confirmó la mayor selectividad de las bandas cuando se utiliza una combinación *EcoRI*+3 x *MseI*+3. Las plantas procedentes de cada método de propagación evaluado mediante AFLP dentro de cada clon, resultaron ser genéticamente idénticas y sólo fueron observadas diferencias entre los tres clones estudiados (Figura 1). Este resultado confirmó la aplicabilidad de los AFLP para el estudio de la estabilidad genética de los materiales vegetales propagados por cultivo *in vitro*, así como de los resultados alcanzados con la caracterización morfoagronómica (Medero *et al.* 2000). Además, garantiza la posibilidad de utilizar las plantas micropropagadas en un esquema de producción de semilla de alta calidad para este cultivo.

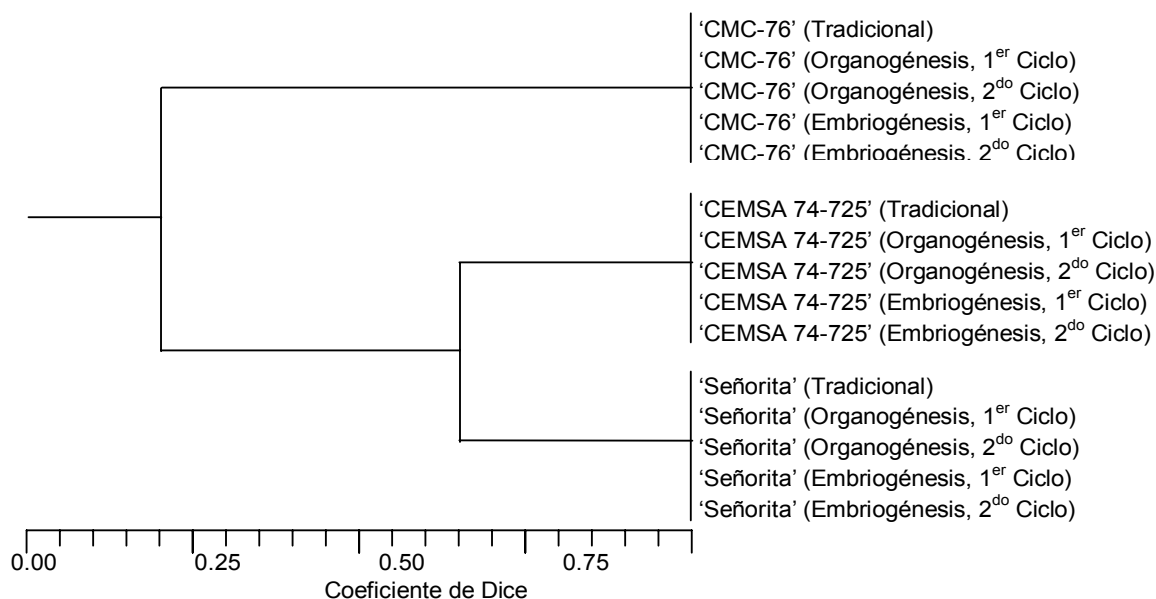


Figura 1. Dendrograma generado según los índices de similitud genética estimados en el análisis de los fragmentos AFLP, obtenidos para diferentes clones de yuca y métodos de propagación con cinco pares de combinaciones de cebadores.

AGRADECIMIENTOS

El colectivo de autores desea agradecer el excelente trabajo de supervisor al Dr. Joe Tohme y la Dra. Miriam Cristina Duque del CIAT, Cali, Colombia y al apoyo en la preparación de las muestras del Dr. Elio Jiménez del IBP, Villa Clara, Cuba. Además, agradecer el extraordinario apoyo brindado por la Red de Biotecnología de la Yuca (CBN) y en especial dedicar estos resultados a la memoria de su coordinadora la Dra. Chusa Ginés.

REFERENCIAS

- Dellaporta, SL, Wood J y Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21
- Freire, M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. C87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba, 100 p.
- Medero, V, Rodríguez S, Borroto C, Gómez R, López J, García M, Ventura J, Cabrera M, Torres M y Alvarez M (2000) Sistema para la embriogénesis somática en clones cubanos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: L.J.C.B Carvalho, A M Thro y A Vilarinhos (Eds.). *Proceeding IV International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Brasilia*, p. 408-419
- Roa, AC (1997) Estimación de la diversidad genética en *Manihot* spp. mediante morfología y marcadores moleculares. Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias-Biología. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Cali, Colombia, 92 p.
- Thro, AM, Taylor N, Raemarkers K, Puonti-Kaerlas J, Schöpke C, Visser R, Iglesias C, Sampaio MJ, Fauquet C, Roca W y Potrykus I (1998) Maintaining the cassava biotechnology network. *Nature biotechnology* 16:428-230
- Tohme, J, González D, Beebe S y Duque MC (1996) AFLP Analysis of Gene Pool of a Wild Bean Core Collection. *Crop Science*. 36 (5): 1375 – 1384
- Vos, P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23 (21): 4407 - 4414