

## Determinación de la estabilidad genética de plantas propagadas *in vitro* de *Vasconcellea x helbornii* Badillo (Badillo) con el uso de marcadores ISSR

Mónica Jadán<sup>1,2</sup>, Shirley Brito<sup>1</sup>, Claudia Segovia<sup>1</sup>, Rafael Gómez-Kosky<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez-Carabaloso<sup>2</sup>, Karina Proaño<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Ave Gral Rumiñahui. Sangolquí. Quito. Ecuador. PO BOX 171-5-31B. e-mail: mbjadan@espe.edu.ec; monica@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

### RESUMEN

Los papayuelos de montaña, entre ellos el babaco [*Vasconcellea x helbornii* Badillo (Badillo)], son originarios del Ecuador y poseen un alto valor nutricional por lo que tiene gran demanda a nivel nacional e internacional. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar a través de marcadores ISSR la estabilidad genética de plantas de babaco propagadas *in vitro*. Se utilizaron hojas jóvenes (uno y dos) de 10 plantas madre (estacas) y de 20 plantas propagadas *in vitro*. Para el análisis se emplearon ocho cebadores. Un total de 55 bandas fueron observadas de las 30 plantas analizadas. Se observó un 100% de *loci* monomórficos entre las plantas madre provenientes de estacas y las plantas propagadas *in vitro*. Este análisis indicó que no existieron diferencias a nivel molecular entre las plantas analizadas, para las combinaciones de cebadores empleadas y que los marcadores ISSR pueden ser usados para este propósito.

Palabras clave: babaco, marcadores moleculares, organogénesis, variación somaclonal

## Determination of genetic stability of *in vitro* propagated plants of *Vasconcellea x helbornii* Badillo (Badillo) using ISSR markers

### ABSTRACT

The mountain papayuelo, among them babaco [*Vasconcellea x helbornii* Badillo (Badillo)], are native of Ecuador and has a great nutritional value, that is it has a huge national and international demand. The objective of the present work was to determine the genetic stability of *in vitro* propagated plants of babaco using ISSR markers. It were used young leaves (one and two) of 10 mother plants (cuttings) and from 20 plants *in vitro* propagated. For the analysis, eight primers were used. Forty five bands were observed from the 30 plants analyzed. It were observed 100% of monomorphic *loci* between stem plants and plants *in vitro* propagated. This analysis indicates that there were no differences at the molecular level between the plants analyzed for the combinations of primers used and the ISSR markers may use for this purposes.

Keywords: babaco, molecular markers, organogenesis, somaclonal variation

### INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Vasconcellea* se cultivan en zonas altas de Sur América especialmente en Ecuador, Colombia y Perú (Schelderman *et al.*, 2011). De las 16 especies que posee Ecuador, el babaco al ser una planta nativa del país muestra un gran potencial como especie cultivable (Robles *et al.*, 2013).

Durante generaciones la propagación de babaco se ha realizado mediante el uso de estacas, el cual es un sistema poco confiable

de producción de plantas a gran escala, por su alto costo y por la propagación de enfermedades. Las técnicas de cultivo *in vitro* son muy útiles para la obtención de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria, donde los métodos tradicionales son difíciles de aplicar. El establecimiento de un protocolo eficiente de regeneración de plantas a través de técnicas de cultivo de tejidos en *Vasconcellea* permite la multiplicación de nuevos individuos, conservación de germoplasma y producción de semillas de mejores características agronómicas (Vélez-Mora *et al.*, 2015).

Sin embargo, las plantas regeneradas por cultivo de tejidos son propensas a alteraciones genéticas debido al estrés inducido por las condiciones de cultivo *in vitro* y el modo de regeneración. La estabilidad genética constituye un requisito esencial para su uso (Bhowmik *et al.*, 2016).

En este sentido, se ha observado variabilidad genética en especies como: *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson (Palombi y Damiano, 2002), *Malus pumila* L. (Mogdil *et al.*, 2005) y en *Vanilla planifolia* Jacks, propagadas vía organogénesis indirecta, donde obtuvieron un 71.66% de polimorfismo (Ramírez e Iglesias, 2015). La variabilidad genética ha estado asociada con el genotipo, el tipo de explante, la composición del medio de cultivo, la forma de regeneración, entre otros factores (Yin *et al.*, 2013).

En babaco se han desarrollado varios trabajos relacionados con el cultivo *in vitro* (Vega y Kitto, 1991; Jordán y Piwanski, 1997; Jordán y Piwanski, 1998; Jordán *et al.*, 2009; Jadán *et al.*, 2016 b) pero no se han realizado estudios referidos a la estabilidad genética de las plantas propagadas.

Los marcadores moleculares para determinar la estabilidad genética de plantas regeneradas *in vitro*, han sido ampliamente utilizados. Los ISSR (del inglés: *Inter Simple Sequence Repeats*) presentan una alta reproducibilidad (Rout *et al.*, 2009; Mohanty *et al.*, 2011; Nayak *et al.*, 2011; Parida *et al.*, 2011; Leva y Petruccielli, 2012). Ellos se basan en el uso de secuencias de microsatélites como cebadores que generan múltiples bandas relacionadas. Varios marcadores tipo microsatélites permiten analizar un gran número de *loci*, lo que da una alta posibilidad de encontrar polimorfismo, incluso entre genotipos relacionados (Carrasco *et al.*, 2009). Son marcadores simples y rápidos que combinan la mayoría de las ventajas de otros tipos de marcadores tales como: SSR (del inglés: *Simple sequence repeats*), AFLP (del inglés: *Amplified fragment length polymorphism*), RAPD (del inglés: *Random amplified polymorphic DNA*) (Ramakrishnan *et al.*, 2014) entre otros.

En babaco, los marcadores ISSR, solo se han empleado para caracterizar la diversidad genética y el flujo de genes entre poblaciones

(Kyndt *et al.*, 2005). Sin embargo, atendiendo a sus ventajas podrían utilizarse en estudios de análisis de la estabilidad genética.

Por todo lo antes expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar a través de marcadores ISSR la estabilidad genética de plantas de babaco propagadas *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Muestras de hojas jóvenes (uno y dos) de 10 plantas madre de babaco (estacas) (PM1-PM10) obtenidas de acuerdo con el protocolo de Jadán *et al.* (2016a) y hojas jóvenes de plantas obtenidas *in vitro* (Jadán *et al.*, 2016 b) con dos meses de cultivo en la fase de aclimatización. Se emplearon dos repeticiones por cada una (1-20).

### *Determinación de la estabilidad genética mediante ISSR*

Se tomaron 200 mg de muestra foliar y se trituraron con nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino, de acuerdo con el protocolo de Khanuja *et al.* (1999) modificado. Una vez extraído el ADN se procedió a preparar el gel de agarosa al 1.0% para determinar su integridad. Posteriormente, se cuantificó y verificó la pureza por espectrofotometría a través de las relaciones 260/280, 260/230 mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE. UU).

Se emplearon ocho cebadores (Ochoa *et al.*, 2008) que se describen en la Tabla 1.

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en 25 µl de volumen final, que incluyó 10 ng de la mezcla de ADN genómico, 2.5 µl de tampón 10xPCR, 50mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 10 mM de dNTP, 2 µl del cebador, 0.4 U de Taq Polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen®), y 18.2 µl de agua ultra-pura. El programa para la PCR fue: desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido por 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación por 45 s y extensión a 72°C por 2 min. Se realizó una extensión final a 72°C durante 7 min. Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en el termociclador TECHNE-TC-512 (EE.UU).

Tabla 1. Cebadores ISSR (Ochoa *et al.*, 2008) utilizados en el análisis molecular de plantas de babaco obtenidas por cultivo *in vitro*.

No.	Cebador	Secuencias (5'- 3')	Temperatura de hibridación (°C)
1	844A	CTCTCTCTCTCTCTAC	52
2	844B	CTCTCTCTCTCTCTGC	54
3	17898A	CACACACACAAC	42
4	17898B	CACACACACAGT	42
5	17899A	CACACACACAAG	40
6	HB9	GTGTGTGTGTGTGG	47
7	HB11	GTGTGTGTGTGTCC	45
8	HB12	CACCACCACGC	40

Una vez que se realizó la PCR se procedió al análisis de los amplicones, estos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% (Dong *et al.*, 2007). La corrida electroforética se realizó a 120 V, 300 mA durante 50 min y el gel fue analizado con el programa *Dolphin-View Imagine System*.

Todas las reacciones con cada cebador ISSR fueron repetidas dos veces. Se calculó el número total de bandas, el promedio de bandas por cebador y el porcentaje de *loci* monomórficos. Las bandas amplificadas se registraron en una matriz binaria de uno (presencia) y cero (ausencia). Se usó el coeficiente de similitud de DICE para el análisis entre las plantas madre y las obtenidas *in vitro*, con la ayuda del paquete estadístico GenAEx 6 (Versión 6) (Peakall y Smouse, 2006) para análisis genéticos en Excel sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través del análisis ISSR se determinó la estabilidad genética de las plantas de babaco propagadas *in vitro*. Los ocho cebadores empleados produjeron bandas fuertes y claras. El número de bandas por cada cebador varió de 1-10 con un promedio de 6.8 bandas por cada uno. El cebador 17899A produjo el mayor número de bandas (10), con tamaño entre 350-2000 pares de bases. Se obtuvo un total de 55 bandas en las plantas analizadas (Tabla 2). Se observó un 100% de *loci* monomórficos entre las plantas madre provenientes de estacas y las plantas propagadas *in vitro* (Tabla 2 y Figura 1).

El coeficiente de similitud alcanzó el valor de uno entre las plantas madre de estacas y las propagadas *in vitro* lo que indicó 100% de similitud entre ellas. Este análisis permitió considerar que no existieron diferencias a nivel molecular para los cebadores analizados.

Todos los cebadores empleados en la presente investigación amplificaron las muestras de ADN analizadas. Ochoa *et al.* (2008) con estos mismos cebadores, en estudios de diversidad genética entre poblaciones de *Polylepis incana* Kunth y *P. pauta* Hieron, lograron la amplificación de 211 bandas de ambas poblaciones, de ellas 202 fueron polimórficas, lo que representó un 95.7% del total, con un promedio de 21 bandas por cebador. Ello demostró la amplia diversidad genética de ambas poblaciones. Sin embargo, para babaco con el empleo de estos cebadores no se encontró polimorfismo entre las plantas propagadas *in vitro* y las obtenidas de estacas, lo que demostró la efectividad de este tipo de marcador también para estudios de estabilidad genética.

Hasta el momento en *Vasconcelleas*, con el empleo de marcadores ISSR, solo se han referido los trabajos desarrollados por Kyndt *et al.* (2005) para caracterizar la diversidad genética y flujo de genes entre diferentes poblaciones de babaco; Ocampo *et al.* (2006) y Kanupriya *et al.* (2012) para analizar el flujo de genes entre *Carica papaya* L. y especies de *Vasconcellea* y Carrasco *et al.* (2014) para caracterizar genéticamente la especie *V.*

Tabla 2. Resultados de ISSR empleados en el análisis de plantas propagadas *in vitro* a partir de secciones de hojas y las plantas de estacas del híbrido babaco (*Vasconcellea x helbornii* Badillo (Badillo) de 8 semanas de cultivo.

Cebador	Secuencia del cebador	Número de bandas	Rango de longitud (pb)
844A	CTCTCTCTCTCTCTAC	1	800-700
844B	CTCTCTCTCTCTCTGC	6	350-2000
17898A	CACACACACACAAC	7	500-2000
17898B	CACACACACACAGT	8	420 -2000
17899A	CACACACACACAAG	10	350-2000
HB9	GTGTGTGTGTGTGG	8	400-1200
HB11	GTGTGTGTGTGTCC	6	480 - 2000
HB12	CACCACCACGC	9	405- 2000
Total		55	

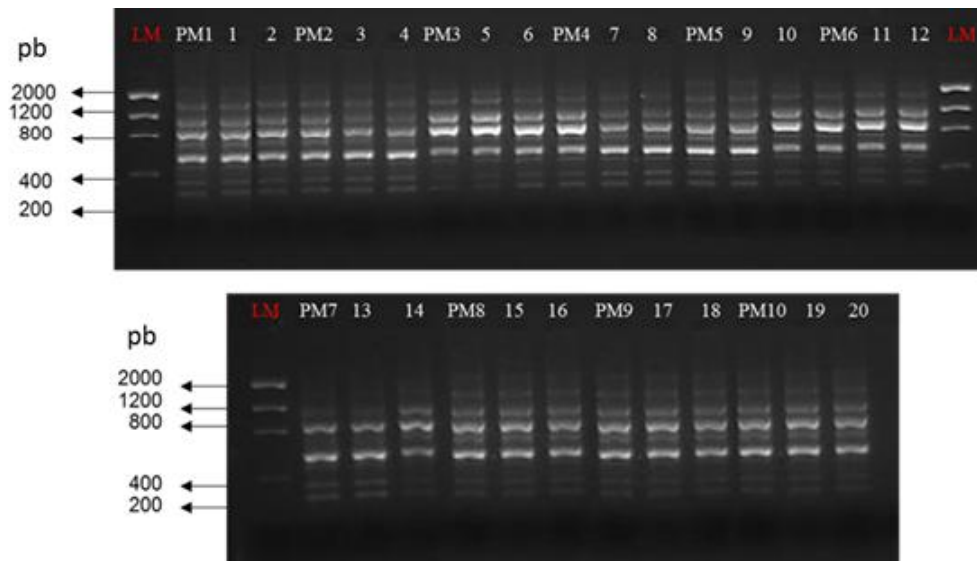


Figura 1. Perfil de bandas ISSR con el cebador 17899A, en plantas propagadas *in vitro* a partir de secciones de hojas del híbrido de babaco (*Vasconcellea x helbornii* Badillo (Badillo) de 8 semanas de cultivo. Plantas propagadas *in vitro* (líneas 1–20), plantas madre (líneas de la PM1–PM10), LM. Marcador de bajo peso molecular, pb. pares de bases.

*chilensis* (Planch. ex A.DC.). Estos resultados constituyen la primera investigación relacionada con estudios de estabilidad genética en plantas de babaco obtenidas por cultivo *in vitro* a través de marcadores ISSR.

La estabilidad genética de plantas regeneradas a través de las técnicas de cultivo *in vitro*, ha sido referida en un gran número de especies, tales como: *Prunus dulcis* L. (Martins *et al.*, 2004), *Phoenix dactylifera* L. (Saker *et al.*, 2006), *Jatropha curcas* L. (Sharma *et al.*, 2011),

*Cleome gynandra* L. (Rathore *et al.*, 2014), entre otras.

Yin *et al.* (2013), en *Lilium* spp. emplearon la misma vía de propagación de plantas a través de la organogénesis directa a partir de secciones de hojas y no detectaron variabilidad genética con el empleo de marcadores ISSR.

El empleo de estos marcadores en el presente estudio constituye un punto de partida importante para su uso en estudios de

estabilidad genética de plantas obtenidas a través del cultivo *in vitro* para cualquiera de las especies de *Vasconcellea*.

## CONCLUSIONES

Los marcadores ISSR pueden ser utilizados en estudios para determinar estabilidad genética de plantas propagadas *in vitro* de babaco, con estos no se encontraron diferencias a nivel molecular entre las plantas *in vitro* y las plantas madre.

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Quito, Ecuador.

## REFERENCIAS

- Bhowmik S, Basu A, Sahoo L (2016) Direct Shoot Organogenesis from Rhizomes of Medicinal Zingiber *Alpinia calcarata* Rosc and Evaluation of Genetic Stability by RAPD and ISSR Markers. *Crop Sci Biotech* 19(2): 157-165; doi: 10.1007/s12892-015-0119-4
- Carrasco B, Ávila P, Pérez-Díaz J, Muñoz P, García R, Díaz C, Lavandero B, Zurita A, Retamales J, Caligari P (2009) Genetic structure of Highland papayas (*Vasconcellea pubescens* (A.DC.) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by inter simple sequence repeats (ISSR). *Genet Resour Crop Evol* 56(3): 331-337; doi: 10.1007/s10722-008-9367-1
- Carrasco B, García R, Díaz C, Ávila P, Cáceres P, Lobos G, Silva H, Caligari D (2014) Genetic and morphological characterization of the endangered Austral papaya *Vasconcellea chilensis* (Planch, ex A. DC.) Solms. *Genet Resour Crop Evol* 61(7): 1423-1432; doi: 10.1007/s10722-014-0143-0
- Dong Y, Burch-Smith TM, Liu Y, Mamillapalli P, Dinesh-Kumar SP (2007) A ligation-independent cloning tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for *NbMADS4-1* and *-2* in floral development. *Plant Physiol* 145(4): 1161-1170; doi: 10.1104/pp.107.107391
- Jadán MG, Gómez-Kosky R, Bermúdez-Carabaloso I (2016 a) Obtención de plantas madre de *Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo a partir de estacas en condiciones semicontroladas. *Biotecnología Vegetal* 16(1): 13-20
- Jadán MG, Basantez K, Gómez-Kosky R, Bermúdez-Carabaloso I (2016 b) Establecimiento *in vitro* de brotes de *Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo. *Biotecnología Vegetal* 16(2): 67-72
- Jordán M, D Piwanski (1997) Regeneration of babaco [*Carica pentagona* (Heilborn) Badillo] using leaf explants and shoot-tip culture. *Rev Intl Bot Exp* 61: 109-115
- Jordán M, D Piwanski (1998) Regeneration of babaco [*Carica pentagona* (Heilborn) Badillo] by somatic embryogenesis. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 64: 101-105
- Jordán M, Vélez D, Armijos R (2009) Biotecnologías aplicables al desarrollo de algunas especies de *Caricaceas* cultivadas en la región Andina: avances y problemas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 3(1): 1-17
- Khanuja PS, Ajit K, Darokar S, Kumar S (1999) Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17(1): 74-74; doi: 10.1023/A:1007528101452
- Kanupriya, Shobhana M, Vasugi C, Aswath C, Radhika V, Reddy L, Dinesh M (2012) Genetic relationship among papaya (*Carica papaya*) and wild papaya (*Vasconcellea* species) using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 82(4): 366-369
- Kyndt T, Haegeman A, Glabeke SV, Maertens I, Droogenbroeck BV, Roldán-Ruiz I, Gheysen G (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci in the highland papaya *Vasconcellea x heilbornii* V Badillo (*Caricaceae*). *Molecular Ecology Notes* 5(3): 590-592; doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00999x
- Leva A, Petruccelli R (2012) Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biol Plant* 56(2): 373-376; doi: 10.1007/s10535-012-0102-6
- Martins M, Sarmiento D, Oliveira M (2004) Genetic stability of micropropagated almond plantlets as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep* 23(7): 492-496; doi: 10.1007/s00299-004-0870-3
- Mohanty S, Panda M, Sahoo S, Nayak S (2011) Micropropagation of *Zingiber rubens* and assessment of genetic stability through RAPD and ISSR markers. *Biol Plant* 55(1): 16-20; doi: 10.1007/s10535-011-0002-1
- Mogdil M, Mahajan K, Chakrabarti S, Sharma D, Sobti R (2005) Molecular analysis of genetic stability in micropropagated Apple rootstock MM106. *Sci Hortic* 104(2): 151-160; doi: 10.1016/j.scienta.2004.07.009

- Nayak S, Kaur T, Mohanty S, Ghosh G, Choudhury R, Acharya L, Subudhi E (2011) *In vitro* and *ex vitro* evaluation of long-term micropropagated turmeric as analyzed through cytophotometry, phytoconstituents, biochemical and molecular markers. *Plant Growth Reg* 64(1): 91-98; doi: 10.1007/s10725-010-9541-2
- Ocampo JP, Dambier D, Ollitrault P, Coppens G, Brottiere P, Froelicher Y, Risterucci A (2006) Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 212-217; doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01197.x
- Ochoa V, Jiménez P, Proaño K, Segovia-Salcedo C (2008) Genética Poblacional de *Polylepis pauti* y *P. incana* en el Páramo de Papallacta. *Revista ESPE Ciencia y Tecnología* 1(1): 71-79
- Palombi M, Damiano C (2002) Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Rep* 20(11): 1061-1066; doi: 10.1007/s00299-001-0430-z
- Parida R, Mohanty S, Nayak S (2011) Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* propagated greater galangal (*Alpinia galanga*) using DNA based markers. *Int J Plant Animal Environ Sci* 1(3): 123-133
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 288-295; doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Ramakrishnan M, Ceasar S, Duraipandiyar V, Ignacimuthu S (2014) Efficient plant regeneration from shoot apex explants of maize (*Zea mays*) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by ISSR markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 119(1): 183-196; doi: 10.1007/s11240-014-0525-1
- Ramírez M, Iglesia L (2015) Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 123(3): 657-664; doi: 10.1007/s11240-015-0868-2
- Rathore NS, Rai MK, Phulwaria M, Rathore P, Shekhawat NS (2014) Genetic stability in micropropagated *Cleome gynandra* revealed by SCoT analysis. *Acta Physiol Plant* 36(2): 555-559; doi: 10.1007/s11738-013-1429-0
- Robles A, Salinas D, Armijos W, Sánchez A, Torres R (2013) Estudio de la Variabilidad Morfológica de Aislados Fúngicos Asociados con la Enfermedad de la Marchitez Vasculare del Babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *pentagona*). *Centro de Biotecnología* 2(1): 34-44
- Rout G, Senapati S, Aparajita S, Palai S (2009) Studies on genetic identification and genetic fidelity of cultivated banana using ISSR markers. *Plant Omics J* 2(6): 250-258
- Saker M, Adawy SS, Mohamed A, El-Itriby HA (2006) Monitoring of cultivar identity in tissue culture-derived date palms using RAPD and AFLP analysis. *Biol Plant* 50(2): 198-204; doi: 10.1007/s10535-006-0007-3
- Sharma S, Pamidimarri D, Anand K, Reddy M (2011) Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. *Ind Crop Prod* 34(1): 1003-1009; doi: 10.1016/j.indcrop.2011.03.008
- Schelderman X, Kyndt T, d'Eeckenbrugge G, Ming R, Drew R, Van Droogenbroeck B, Van Damme P, Moore P (2011) *Vasconcellea*. En: Kole C (Ed). *Wild crop relatives: genomic and breeding resources, tropical and subtropical fruits*, pp. 213-249. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin; ISBN: 978-3-642-20446-3
- Vega R, Kitto S (1991) Regeneration of Babaco (*Carica pentagona*) from Ovular callus. *United States. Journal of the American Society for Horticultural Science* 116(4): 747-752
- Vélez-Mora DP, Aemijos GR, Jordán MZ (2015) Enhancement of germination, hyperhydricity control and *in vitro* shoot formation of *Vasconcellea stipulata* Badillo. *Revista Colombiana de Biotecnología XVIII*(2): 16-21; doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.43611
- Yin ZF, Zhao B, Bi WL, Chen L, Wang QC (2013) Direct shoot regeneration from basal leaf and of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerates by ISSR and AFLP markers. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 49(2): 333-342; doi: 10.1007/s11627-013-9501-4

Recibido: 22-03-2017

Aceptado: 31-05-2017