

Obtención de perfiles genéticos de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni propagadas mediante cultivo *in vitro* y corte de esquejes

Dionys González-Hernández^{1,2*}, Elizabeth Kairúz Hernández-Díaz^{1,2}, Alina Capote¹, Anabel Pérez¹, Leonardo Rivero¹, Borys Chong-Pérez^{1,3}, Naivy Pérez-Alonso¹

¹Instituto 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.

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

³Sociedad de Investigación y Servicios BioTECNOS Ltda. Camino a Pangal km 2,5. San Javier. Linares. Chile. CP 3660000.

*Autor para correspondencia e-mail: dionys@uclv.cu

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni es una especie reconocida a nivel mundial por sus propiedades medicinales. El objetivo de este trabajo fue obtener perfiles genéticos de plantas cultivadas *in vitro* y otras propagadas mediante corte de esquejes para detectar polimorfismos genéticos. Para ello, primero se evaluaron dos protocolos de extracción de ADN, ambos con modificaciones. Las muestras purificadas se utilizaron para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico con seis pares de cebadores. A partir de los patrones de bandas, se confeccionó una matriz de datos y se calculó la similitud y la distancia genética entre ambos grupos de plantas. Solo fue posible obtener ADN genómico cuando se aplicó el protocolo propuesto por Doyle y Doyle con modificaciones. De los seis cebadores empleados, solo uno fue efectivo para la amplificación de segmentos de ADN de esta especie. El protocolo de purificación propuesto es rápido, simple y eficiente. Se recomienda para la extracción de muestras ADN en la especie. Estas pueden ser empleadas en la implementación de otras técnicas para el estudio de la variabilidad genética y la detección de variaciones somaclonales en *S. rebaudiana*.

Palabras clave: ADN, distancia genética, polimorfismos, protocolo de purificación, RAPD

Obtaining genetic profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni plants propagated by *in vitro* culture and cuttings

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni is worldwide known for its medicinal properties. The objective of this work was to obtain genetic profiles of *in vitro* grown plants or propagated by cuttings to detect genetic polymorphisms. For this, two DNA extraction protocols were first evaluated, both with modifications. The purified samples were used for random amplification of polymorphic DNA with six pairs of primers. A matrix of data was made from the band patterns. The similarity and genetic distance between both groups of plants were calculated. Genomic DNA was obtained only when the modified protocol proposed by Doyle and Doyle was applied. One of the six primers used was effective for the amplification of DNA segments. In this work, we provide a fast, simple and efficient DNA purification protocol for *S. rebaudiana* leaf samples. This might be applied for the study of genetic variability and the detection of somaclonal variations using other PCR-based techniques.

Keywords: DNA, extraction protocol, genetic profile, polymorphisms, RAPD

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana es una especie que crece preferiblemente en zonas subtropicales, en Paraguay, Kenya, China y Estados Unidos. Sin embargo, su progresiva demanda la ha convertido en un importante renglón comercial a nivel mundial (Gantait *et al.*, 2014). Las plantas de *Stevia* contienen una compleja mezcla de glucósidos naturales diterpénicos dulces (glucósidos de esteviol) con un poder endulzante de más de 200 veces que la sacarosa. Estos constituyen una alternativa viable para pacientes con enfermedades del metabolismo de los carbohidratos, como la *Diabetes mellitus* (Gantait *et al.*, 2017).

El cultivo *in vitro* como método de propagación de esta especie destaca sobre la reproducción convencional, debido a que permite obtener mayor cantidad de plantas (Shahid *et al.*, 2014). Sin embargo, el cultivo de tejidos puede generar variaciones somaclonales. La identificación de estas variaciones en estadios tempranos, así como la disminución de su frecuencia de aparición, son elementos primordiales para el control de la calidad durante el desarrollo de cualquier protocolo de propagación de plantas *in vitro* (Krishna *et al.*, 2016).

Para estudiar la variación genética existente entre individuos, se emplean marcadores moleculares; segmentos de ADN utilizados para obtener información sobre la variación alélica y distinguir así a los individuos. La Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD, por sus siglas del inglés), es una técnica que emplea marcadores moleculares, y que ha sido utilizada con éxito para detectar polimorfismos genéticos, identificar variaciones somaclonales en individuos obtenidos por cultivo *in vitro*, y generar perfiles genéticos de diversas especies (Chattopadhyay *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2017).

Para estos propósitos, la extracción de material genético limpio, libre de macromoléculas celulares (polisacáridos, fenoles, proteínas y ARN) constituye el paso fundamental en cualquier técnica molecular que tenga como objetivo la caracterización genética (Velázquez *et al.*, 2014).

El presente estudio se realizó con el objetivo de obtener perfiles genéticos de plantas de

Stevia rebaudiana, que pueden ser aplicados en la detección de polimorfismos genéticos resultantes de la incidencia de variaciones somaclonales. Para ello, primero se evaluaron dos protocolos de extracción de ADN genómico a partir de hojas de plantas cultivadas *in vitro* y plantas propagadas mediante corte de esquejes. Luego, se aplicó la técnica de RAPD y se analizaron los patrones electroforéticos resultantes para la comparación de ambos grupos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon hojas de dos grupos de plantas de *S. rebaudiana* crecidas en casa de cultivo. El primer grupo provenía del manejo tradicional mediante corte de esquejes realizado a las plantas del Banco de Germoplasma del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba. Consistía en esquejes que se encontraban a los 60 días de crecimiento luego de la implementación de dicho manejo.

El segundo grupo de plantas provenía del cultivo *in vitro*. Estas habían sido obtenidas mediante el protocolo propuesto por González-Hernández *et al.* (2019) y contaban con igual período de tiempo desde su establecimiento en casa de cultivo. Ambos grupos se mantuvieron en sustrato orgánico a base de compost de cachaza y se les realizó manejo cultural basado en saneamiento de plagas, fertilización y riego, limpieza de malezas y aplicación de fungicidas.

Evaluación de protocolos de extracción de ADN

Para la extracción del ADN, se evaluaron dos protocolos: uno presentado por Doyle y Doyle (1990) y otro propuesto por Khayat *et al.* (2004), ambos con modificaciones.

En el primero, se tomaron 200 mg de tejido vegetal y se trituraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se adicionó 1 ml de tampón de extracción compuesto por 4% (m/v) CTAB (cetil-trimetil bromuro de amonio), 10 mM Tris-HCl/pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (ácido etilén-diamino-tetracético), 2% (m/v) PVP 10 000, 10 mM mercaptoetanol y se homogenizó durante unos segundos. Las muestras fueron incubadas a 55 °C durante

30 min y posteriormente centrifugadas a 2 800 *g* y 4 °C, durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se le adicionó RNAsa (200 µg ml⁻¹ de concentración final) por 15 min a 37 °C. El extracto fue mezclado con igual volumen de cloroformo y luego centrifugado en iguales condiciones. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron 700 µl de 2-isopropanol helado. Las muestras se mantuvieron toda la noche a -20 °C y posteriormente se centrifugaron a 13 500 *g* y 4 °C, durante 15 min. El precipitado resultante se lavó con 500 µl de etanol 70% (v/v), se centrifugó según las condiciones anteriormente mencionadas y fue secado en campana por 15 min. A continuación se resuspendió en 30 µl de agua desionizada.

En el segundo protocolo analizado, a 200 mg del material vegetal se adicionó 1 ml de tampón de extracción compuesto por 2% (m/v) CTAB, 10 mM Tris-HCl/pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% (m/v) 2-mercaptoetanol previamente calentado a 65 °C. Las muestras fueron incubadas a esa temperatura durante 30 min y mezcladas frecuentemente utilizando un vórtex. Luego se adicionó RNAsa (10 µg ml⁻¹ de concentración final) y se incubaron por 15 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron 700 µl de cloroformo, se mezcló y se procedió a centrifugar las muestras a 5 480 *g* durante 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa a tubos limpios y se repitió el paso anterior. Luego se le adicionaron 700 µl de isopropanol helado, y tras mezclarlo se mantuvo a -20 °C por 1 h. A continuación, se centrifugó a 11 180 *g* a temperatura ambiente, durante 15 min. El precipitado resultante se lavó con 1 ml de tampón de lavado (etanol 76%, v/v, 10 mM acetato de amonio) durante 20 min con agitación frecuente. Luego se centrifugó según las condiciones anteriormente mencionadas y se dejó secar al vacío por 20 min. El precipitado final, se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

En ambos casos, se comprobó la integridad del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (m/v). Como criterio de pureza se determinaron las razones de Absorbancia a 260/230 nm y a 260/280 nm y la concentración de ADN de doble cadena, empleando un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemania). El

proceso de aislamiento de ADN se realizó tres veces para cada muestra.

Obtención de perfiles genéticos

Para establecer un perfil genético que permitiera determinar el nivel de variabilidad genética asociada al proceso de propagación, se seleccionaron hojas jóvenes procedentes de cinco plantas cultivadas *in vitro* y de cinco plantas propagadas por corte de esquejes. Tras el lavado se procedió a extraer el ADN según el protocolo seleccionado en el experimento anterior. Luego de comprobadas la integridad y el criterio de pureza de las muestras obtenidas, se procedió a ajustarlas a una misma concentración de ADN.

Las secuencias de los seis cebadores empleados para para la amplificación de RAPD fueron: R1: 5´-CGACCGCAGT-3´, R2: 5´-CCCTCTGCGG-3´, R4: 5´-AGCCATTGTC-3´, R5: 5´-GCTCAGGACG-3´, R6: 5´-GCCGTCGGGC-3´, R14: 5´-CTAAGCCATG-3´. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó un *Kit de PCR Core* con Taq polimerasa (Sigma), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El programa empleado fue el siguiente: 4 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 36 °C, y 90 segundos a 72 °C; seguido de 10 min a 72 °C. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

Al producto de amplificación se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v), empleando el marcador *GeneRuler 100pb DNA Ladder Plus, ready-to-use* y el colorante *EZVision (Biotechnology)*. Las bandas resultantes del RAPD fueron interpretadas según la presencia/ausencia de polimorfismos como valores binarios (1/0 respectivamente), con ellos se confeccionó una matriz de datos. La similitud y la distancia genética entre las diferentes muestras se calculó de acuerdo con la metodología de Nei (1972), utilizando el servidor web *DendroUPGMA* (García-Vallvé y Puigbò, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de protocolos de extracción de material genético

El empleo del protocolo propuesto por Khayat *et al.* (2004) no fue efectivo para extraer

material genético a partir de muestras de *S. rebaudiana*. Sin embargo, sí fue posible aislar ADN genómico de esta planta, empleando el protocolo de Doyle y Doyle (1990) con modificaciones.

La extracción y purificación exitosa de ADN constituye el punto más importante para obtener resultados confiables al iniciar cualquier estudio molecular y depende, entre otros factores, del protocolo de extracción utilizado y de su efectividad (Velázquez *et al.*, 2014). Los protocolos analizados en el presente trabajo se basan principalmente, en la capacidad del CTAB para precipitar el ADN y evitar las co-precipitaciones con polisacáridos (Rahman *et al.*, 2010). No obstante, difieren en las concentraciones de dicho agente, en los tiempos y temperaturas de incubación para la forma de ruptura de la muestra, la velocidad de la centrifugación, el tampón de lavado, entre otros aspectos. Este último resulta especialmente significativo, ya que uno de los pasos más importantes dentro del proceso de purificación es el lavado, el cual influye significativamente en el criterio de pureza del ADN (Velázquez *et al.*, 2014).

El protocolo propuesto por Khayat *et al.* (2004) ha sido ampliamente utilizado con anterioridad para la extracción de ADN genómico de

plantas (James *et al.*, 2004, Chong-Pérez *et al.*, 2012), con incluso mejores resultados, para algunas especies, que otros protocolos clásicos como el de Dellaporta *et al.* (1983); pero no ha sido probado con anterioridad en *Stevia*. En el presente estudio, la implementación de este protocolo no mostró resultados favorables, que pudieran estar dados por una deficiencia en la ruptura de las células y la consecuente liberación del material genético (Velázquez *et al.*, 2014) o por su posible degradación (Rahman *et al.*, 2010).

Por otra parte, el protocolo de Doyle y Doyle (1990), también ha sido extensamente empleado, incluso para la especie objeto de estudio (Thiyagarajan y Venkatachalam, 2015; Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016; Aguilar *et al.*, 2017). Este sí permitió realizar una extracción efectiva. Las muestras obtenidas fueron consideradas de buena calidad, con valores de absorbancia medios de 1.75 para la relación 260/280 y 1.06 para 260/230 (Tabla 1). El grado de pureza de ADN, en ocasiones, puede incrementarse si se aumenta el tiempo de incubación en el tampón de lavado; pues este reduce los efectos de repulsión entre las cadenas, permite su autoplegamiento y disminuye su solubilidad, sin afectar la integridad o concentración del material genético aislado (Velázquez *et al.*, 2014).

Tabla 1. Concentración y pureza de ADN obtenido de *Stevia rebaudiana*.

Muestras	ADN($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$)	DO	
		260/280	260/230
1a	251.1	1.70	0.67
2a	738.7	1.67	1.06
3a	524.5	1.63	1.09
4a	231.9	1.76	1.03
5a	504.8	1.84	1.83
1b	413.4	1.82	0.68
2b	501.8	1.64	1.05
3b	417.1	2.04	1.21
4b	438.5	1.64	0.87
5b	873.6	1.79	1.12

Leyenda: a. ADN de plantas micropropagadas. b. ADN de plantas propagadas por esquejes

La implementación del protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) modificado, es una alternativa menos costosa, en comparación con el empleo de un kit de extracción comercial. Puede ser realizado en alrededor de tres horas, en dependencia de la habilidad del especialista que lo ejecute y la cantidad de muestras. Debido a su laboriosidad y la capacidad de centrifugación, no se recomienda que sea aplicado para más de 24 muestras por purificación. Adicionalmente, permite obtener altas concentraciones de ADN necesarias cuando se requiere aplicar posteriormente técnicas no basadas en PCR, como la Hibridación por Southern. El protocolo propuesto es recomendable para la extracción de ADN de *S. rebaudiana*, debido a la sencillez de sus condiciones (solo se requiere un baño térmico y una centrifuga convencional), el bajo costo de los reactivos (en comparación con los kit comerciales), y la efectividad de sus resultados.

Obtención de perfiles genéticos

De los seis cebadores empleados en las reacciones de amplificación, solo en uno (R1)

fue posible observar la presencia de bandas. Los cebadores R2, R4, R5, R6 y R14 no produjeron amplificación.

En el patrón de amplificación RAPD obtenido utilizando el cebador R1: 5´-CGACCGCAGT-3´, se produjeron 63 bandas totales para las 10 muestras analizadas. Estas se encontraron distribuidas en 12 líneas de bandas, de las cuales solo dos fueron comunes para todas las muestras (monomórficas). El resto de las bandas resultaron polimórficas y variaron en número entre una y siete para cada muestra (Figura 1). Esto resultó en un polimorfismo del 83.3%.

Los valores de similitud estuvieron entre 0.33 y 1.00 para una diferencia genética entre 0 y 0.66 (Tabla 2). Adicionalmente, la variabilidad de la distancia genética entre ambos grupos se representó en la figura 2. No se detectaron diferencias significativas entre los perfiles genéticos de las plantas cultivadas *in vitro* y las propagadas mediante cortes de esquejes. Sin embargo, la obtención de un mayor número de bandas es necesaria para excluir la aparición de variaciones somaclonales asociadas al cultivo *in vitro* de esta especie.

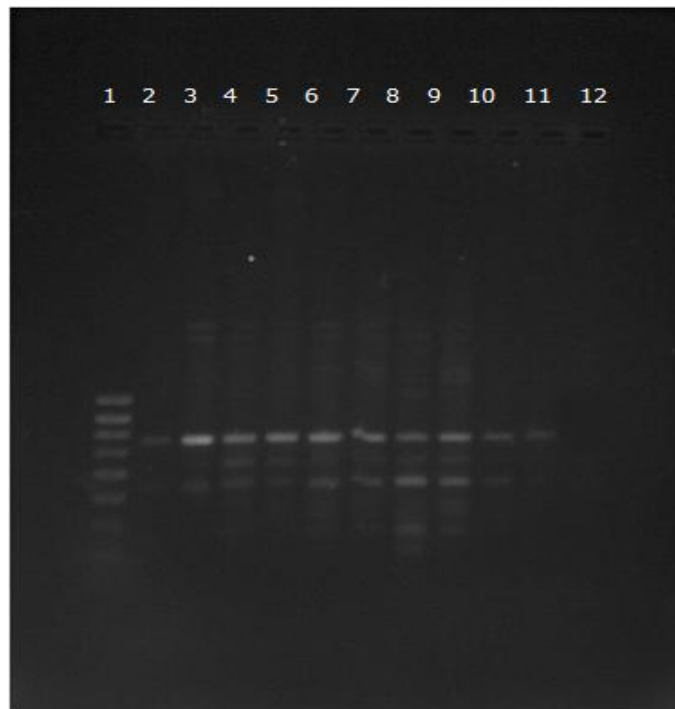


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del patrón de amplificación RAPD obtenido utilizando el cebador R1. 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus, ready-to-use, 2-6: muestras de plantas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*, 7-11: muestras de plantas de *S. rebaudiana* propagadas por cortes de esquejes, 12: control negativo.

Tabla 2. Matriz de similitud genética entre las muestras analizadas (a) plantas propagadas *in vitro* y (b) plantas propagadas por cortes de esquejes de *Stevia rebaudiana*.

Muestras	1a	2a	3a	4a	5a	1b	2b	3b	4b	5b
1a	1	0.500	0.444	0.571	0.364	0.364	0.333	0.333	0.800	1.000
2a		1	0.769	0.909	0.667	0.800	0.750	0.750	0.667	0.500
3a			1	0.833	0.750	0.750	0.824	0.706	0.400	0.444
4a				1	0.714	0.714	0.667	0.667	0.500	0.571
5a					1	0.889	0.737	0.947	0.333	0.364
1b						1	0.737	0.947	0.500	0.364
2b							1	0.800	0.462	0.333
3b								1	0.462	0.333
4b									1	0.800
5b										1

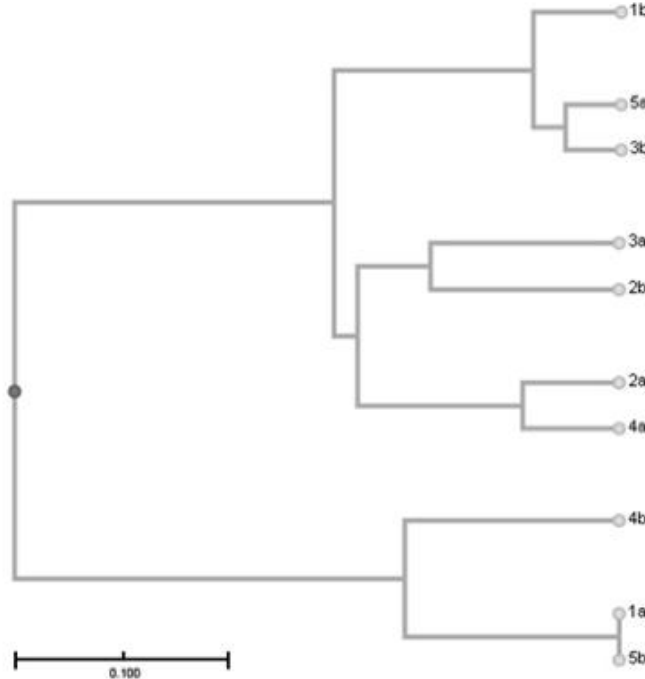


Figura 2. Dendrograma UPGMA de distancia genética calculado de acuerdo con el perfil electroforético obtenido con el cebador R1, a partir de muestras de ADN genómico de plantas de *Stevia rebaudiana* (a) propagadas *in vitro* y (b) propagadas por cortes de esquejes.

Aunque estos resultados no sean robustos, el producto de amplificación de un solo cebador con muchas bandas, permite inferir un perfil genético preliminar y tener una idea general sobre el grado de similitud y distancia genética (Moktaduzzaman y Mahbubur-Rahman, 2009). El dendrograma UPGMA de distancia genética confeccionado con los datos obtenidos mostró que la variabilidad genética entre ambos grupos de

plantas es similar. Estos valores corresponden a la variabilidad genética individual intrínseca dentro de una misma especie (Meléndez, 2019).

En la literatura científica se refiere con frecuencia que solo una parte de los cebadores totales utilizados en la técnica de RAPD llega a aportar productos de amplificación, como ocurrió en el presente

estudio. Tal es el caso del trabajo de Muktaduzzaman y Mahbubur-Rahman (2009) quienes probaron dos cebadores y solo con uno de ellos se produjo amplificación. Por su parte, Modi *et al.* (2012) emplearon un total de 80 cebadores de los cuales solo seis fueron efectivos para la identificación de bandas.

De cualquier modo, los datos de la amplificación de un solo cebador no son suficientes para establecer un perfil genético completo. Además, la aplicación de la técnica de RAPD tiene algunas desventajas a tener en cuenta. Entre ellas las más significativas son la presencia de bandas iguales que pueden ser el resultado del peso molecular de los fragmentos y no deberse a la similitud en su secuencia. También, pueden ocurrir solapamientos entre las bandas, enmascarando los resultados. De igual manera, la ausencia de bandas no puede ser atribuida exclusivamente a la falta de la secuencia esperada, pues puede ser consecuencia de fallos en la amplificación por otros motivos, como la degradación de la muestra o baja concentración de ADN (Kumari y Thakur, 2014). Esto último puede ser minimizado con la optimización del protocolo de purificación, como se propuso en la sección anterior.

La implementación de la técnica RAPD, en este trabajo y otros (Muktaduzzaman y Mahbubur-Rahman, 2009, Modi *et al.*, 2012), no resultó satisfactoria para determinar variaciones somaclonales. Sin embargo, existen otras técnicas que se pueden emplear con este fin (Yadav *et al.*, 2017). Estas incluyen el uso de marcadores moleculares para determinar polimorfismos genéticos, que se pueden clasificar en tres grupos: los marcadores basados en hibridación de ADN, los basados en PCR y los específicos basados en secuenciación de ADN. Entre los primeros son más reconocidos las técnicas para detectar Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs) y las huellas específicas de oligonucleótidos. Dentro de los marcadores basados en PCR se encuentran la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico, la Repetición de Secuencia Simple o microsatélites (SSRs) y los polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs). Mientras que el principal marcador

específico basado en secuenciación de ADN es el análisis de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs).

Aun así, si se desea emplear la técnica de RAPD para la detección de polimorfismos en futuros estudios con *S. rebaudiana*, es imprescindible la utilización de un alto número de pares de cebadores para asegurar la obtención de mayor número de amplificaciones. Además, es recomendable la aplicación de otras técnicas moleculares que pudieran ser más efectivas en el análisis de material genético de esta especie (como AFLP o ISSR). Estas técnicas deberán ser estandarizadas para la obtención de datos suficientes que permitan concluir sobre el efecto del cultivo *in vitro* sobre la variabilidad genética de esta especie. Asimismo, estos estudios contribuirán a la optimización de protocolos de propagación masiva de plantas que no afecten la identidad genética del cultivo.

CONCLUSIONES

Es posible obtener perfiles genéticos de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni propagadas mediante corte de esquejes y cultivadas *in vitro*. El protocolo de extracción de ADN propuesto en este trabajo es efectivo y permite aplicar técnicas basadas en PCR para la detección de polimorfismos genéticos.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Aguilar B, Maldonado H, de Querétaro S (2017) Metilación diferencial en plantas de Estevia, con y sin aplicación de elicitores. En: Martínez-Herrera (eds). Seguridad Alimentaria: Aportaciones Científicas y Agrotecnológicas, pp. 263-266. UJAT, Tabasco México
- Bermúdez-Guzmán MdJ, Guzmán-González S, Orozco-Santos M, Velázquez-Monreal JJ, Buenrostro-Nava MT, Michel-López CY (2016) Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. Revista mexicana de ciencias agrícolas 7(4): 897-910

- Chattopadhyay K, Bhattacharya S, Mandal N, Sarkar H (2008) PCR-based characterization of mung bean (*Vigna radiata*) genotypes from Indian subcontinent at intra-and inter-specific level. *Journal of plant biochemistry and biotechnology* 17(2): 141-148
- Chong-Pérez B, Kosky RG, Reyes M, Rojas L, Ocaña B, Tejeda M, Pérez B, Angenon G (2012) Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre//lox site-specific recombination system. *Journal of biotechnology* 159(4): 265-273
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter* 1(4): 19-21
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Gantait SL, Das A, Mandal N (2014) Stevia: A Comprehensive Review on Ethnopharmacological Properties and *In vitro* Regeneration. *Sugar Tech* 17(2): 95-106
- Gantait S, Das A, Banerjee J (2017) Geographical Distribution, Botanical Description and Self-Incompatibility Mechanism of Genus *Stevia*. *Sugar Tech* 20(1): 1-10; doi: 10.1007/s12355-017-0563-1
- Garcia-Vallvé S, Puigbò P (2002) DendroUPGMA: A dendrogram construction utility. Disponible en: <http://genomes.urv.es/UPGMA/>. Consultado 14/02/2018
- González-Hernández D, Kairuz E, Capote A, Pérez A, Rivero L, Chong-Pérez B, Pérez-Alonso N (2019) Micropropagación de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de explantes *ex vitro*. *Biotecnología Vegetal* 19(1): 53-63
- James A, Peraza-Echeverría S, Peraza-Echeverría L, Herrera-Valenci V (2004) Variation in micropropagated plants. *Acta Horticulturae* 748: 55-63
- Khayat E, Duvdevani A, Lehav E, Ballesteros BA (2004) Somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). Genetic mechanism, frequency, and application as a tool for clonal selection. En: Jain S, Swennen R (eds). *Banana improvement: Cellular, molecular biology and induced mutation*, pp. 99-109, Science Publishers Inc, Plymouth, UK
- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M, Sadh R K (2016) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6(1): 54; doi: 10.1007/s13205-016-0389-7
- Kumari N, Thakur SK (2014) Randomly Amplified Polymorphic DNA-a brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 9(1): 6-13; doi: 10.3844/ajavssp.2014.6.13
- Meléndez J T (2019) Especiación y esencialismo biológico intrínseco. *Teorema. Revista internacional de filosofía* 38(1): 5-23
- Modi AR, Patil G, Kumar N, Singh AS, Subhash N (2012) A Simple and Efficient *In vitro* Mass Multiplication Procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and Analysis of Genetic Fidelity of *In vitro* Raised Plants Through RAPD. *Sugar Tech* 14(4): 391-397; doi: 10.1007/s12355-012-0169-6
- Moktaduzzaman M, Mahbubur-Rahman SM (2009) Regeneration of *Stevia rebaudiana* and Analysis of Somaclonal Variation by RAPD. *Biotechnology* 8(4): 449-455; doi: 10.3923/biotech.2009.449.455
- Nei M (1972) Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106(949): 283-292; doi: 10.1086/282771
- Rahman SASA, Mohamed Z, Othman RY, Swennen R, Panis B, De Waele D, Remy S, Carpentier SC (2010) In planta PCR-based detection of early infection of plant-parasitic nematodes in the roots: a step towards the understanding of infection and plant defense. *European journal of plant pathology* 128(3): 343-351
- Shahid K, Roshan Z, Nisar A (2014) Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences* 21(6): 566-573; doi: 10.1016/j.sjbs.2014.02.005
- Sharma N, Kaur R, Era V (2016) Potential of RAPD and ISSR markers for assessing genetic diversity among *Stevia rebaudiana* Bertoni accessions. *Indian Journal of Biotechnology* 15(1): 0975-0967

Thiyagarajan M, Venkatachalam P (2015) Assessment of genetic and biochemical diversity of *Stevia rebaudiana* Bertoni by DNA fingerprinting and HPLC analysis. *Annals of Phytomedicine* 4(1): 79-85

Velázquez LPA, Martínez MdCA, Romero AC (2014) Extracción y purificación de ADN. En: Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha MG (eds). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, pp. 1-25. INECC-SEMARNAT, México DF

Yadav AK, Tomar SS, Jha AK, Singh J (2017) Importance of Molecular Markers in Livestock

Improvement: A Review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research* 5(4): 614-622

Recibido: 24-07-2019

Aceptado: 11-09-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.