



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Evaluación del efecto de los ciclos de cultivo y reguladores de crecimiento sobre la estabilidad genética en el cultivo de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* usando marcadores ISSR.

Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

AUTOR

Paúl Marcelo Córdova Leiva

DIRECTORA

Ing. Rosa Enith Armijos González

Loja- Ecuador

2012

CERTIFICACIÓN

Ingeniera
Rosa Armijos González
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por el Sr. Paúl Marcelo Córdova Leiva, previo a la obtención del Título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 03 de Mayo de 2012

.....
Ing. Rosa Armijos González
DIRECTORA

AUTORÍA

Las ideas, conceptos y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autor.

Paúl Marcelo Córdova Leiva.

DEDICATORIA

A mi familia por apoyarme siempre.

Paúl Marcelo Córdova Leiva

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud:

A la Universidad Técnica Particular de Loja que por medio del Instituto de Ecología y la Escuela de Bioquímica y Farmacia me ha dado la oportunidad de formarme y preparar la presente investigación.

A mis Padres y hermanos por su apoyo y confianza depositada en mí durante mi carrera universitaria, sobre todo a las palabras sabias que me han iluminado en el periodo de estudio.

A mi tutora Ing. Rosa Armijos González por su ayuda en la elaboración de mi proyecto de fin de carrera.

A todos los maestros que generosamente me han impartido sus conocimientos.

Paúl Marcelo Córdova Leiva

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Paúl Marcelo Córdova Leiva declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Paúl Marcelo Córdova Leiva.
TESISTA

Ing. Rosa Armijos González.
DIRECTORA DE TESIS

ÍNDICE

Índice de contenidos.	Pág.
CERTIFICACIÓN.....	I
AUTORÍA	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS.....	V
ARTICULO CIENTIFICO	VIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
OBJETIVOS	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES	32
ANEXOS	33
Anexo 1. Preparación de medio GAMBORG'S B5 (1968), con y sin reguladores de crecimiento.....	33
Anexo 2. Protocolo para la extracción de ADN.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración hormonal usada en segmentos nodales.....	17
Tabla 2. Secuencia de trece cebadores Evaluados inicialmente	19
Tabla 3. Temperaturas de alineamiento de los cebadores	20
Tabla 4. Bandas Monomórficas y polimórficas.....	23
Tabla 5. Porcentaje de la Variación Somaclonal de segmentos nodales de los tres tratamientos influenciados por los tres sub-cultivos	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Cinchona officinalis</i>	5
Figura 2. Amplificación con un cebador (CA) anclado en el extremo 5' prima con tres nucleótidos extras	16

Figura 3. Cultivo <i>in vitro</i> y diseño experimental	18
Figura 4. Tratamientos de segmentos nodales.....	22
Figura 5. Patrones de ADN después de la amplificación usando el cebador 834	23
Figura 6. Comparación de los tres tratamientos	25
Figura 7. Dendrograma.....	27

Evaluation of the effect of culture cycles and growth regulators on genetic stability in the nodal segments cultivation of *Cinchona officinalis* using ISSR markers

Paúl Córdova Leiva¹

¹Escuela de Bioquímica y Farmacia, Universidad Técnica Particular de Loja. S/N San Cayetano Alto, Loja - Ecuador

pmscordova@utpl.edu.ec

Abstract

Cinchona officinalis is an endemic species of the valley of Loja - Ecuador. This has been categorized as threatened since the ninetieth century due to the over-extraction of its peel for medical uses. The purpose of this research was to determine the somaclonal variation in cultures of nodal segments of *C. Officinalis*, cultivated in Gamborg medium (1968) with two different hormonal combinations 0.1NAA-0.5 BAP (A) and 0.1NAA-1.0 BAP (B). To estimate the genetic differences, the somaclones were compared with their corresponding mother plants with the help of the ISSR markers. Somaclonal variation was detected in the evaluated treatments, averaging approximately 42.5% in (B) and 37% in (A). The somaclonal variation was also affected by the culture cycles, beginning in the first cycle, with differences observed in treatments (A) and (B), and B5 medium (C) in the third subculture.

Keywords: Somaclonal Variation, Growth Regulators, NAA, BAP and B5.

Abbreviations: ISSR - Inter simple sequence repeats; NAA – α -Naphthaleneacetic Acid; BAP – 6-Benzylaminopurine; B5 – Gamborg medium (1968).

Introduction

The quinas are species of the genus *Cinchona*, and are widespread in the tropical and equatorial zone of the Andes mountain range from 12° of longitude north until 20° longitude south [1]. In the forests of Cajanuma and Uritusinga, located in the province of Loja, the quinas have been exploited since nineteenth century for medical application; the peel can be used for medical purposes because it contains secondary metabolites (alkaloids) [2]. Valencia et al. [3] mentioned that the expanding extraction of the trees and the changes in the habitat, have caused some species of this genus are categorized as threatened.

Inside of this genus exist endemic species localized in small geographic areas, like *Cinchona officinalis*, which can only be found in the Loja valley, in southern Ecuador [1,4]. The locations of this species represent the specific environmental conditions that are

required for adequate germination and development of the plantlets [4]. *In vitro* technique can be used in propagation and conservation of endemic species, Plant regeneration *in vitro* and reintroduction into natural habitat is one strategy for conservation of plant species [5].

The application of growth regulators and the recurrent subculture hinders maintenance of genetic fidelity in the tissue cultured clones [6]. The culture system chosen for this investigation is the nodal segments culture. Several studies indicate that the frequency of somaclonal variation in plants regenerated by this system is low versus high levels of variability in other regenerating systems as callus formation, organogenesis, suspension cultures, etc. [7].

The detection of genetic changes can be compared with the phenotype a/o genotype of the starting material to the material obtained

in the *in vitro* culture. PCR based DNA markers such as RAPD, SSR, ISSR and AFLP have several advantages and have been used for genotyping and detecting polymorphism/variability in plants [8].

The advantages of inter-simple sequence repeats (ISSR) include low quantities of template DNA requirement, no need of sequence data for primer construction, random distribution throughout the genome, generation of many informative bands per reaction, and reliable and reproducible production [9]. The purpose of this research was to evaluate the effect of the growth regulators and the culture cycles about the genetic stability in cultures of nodal segments using ISSR markers.

Materials and Methods

In vitro micropropagation

The research was developed from the four individuals (mother plants) grown from seeds germinated *in vitro* in the Gamborg medium (1968) in which two individuals were exposed to treatment A and two treatment B with its own control (Figure 1 and 2), once they reached approximately 6 cm in length, preceded to the extraction of DNA from leaves and the subcultures of the nodal segments of the plantlets, this was done in three sub-cultures. Samples (leaves) were stored at -80 ° C.



Figure 1. *In vitro* culture and experimental design. Mother Plant) Plantlet obtained from a seed cultured *in vitro* in B5 medium. **1st cycle)** Nodal segments subcultured from the mother plant, these exposed to treatment A y control, the segments of the treatment A were cultured in medium with growth regulators for 60 days. **2nd cycle)** Nodal segments subcultured from individuals of the 1 cycle. **3rd cycle)** Nodal segments subcultured from individuals of the 2 cycle. Of the 1, 2 and 3 cycles of the treatment A and control were taken a sample (nodal segment) for each, randomly selected for comparison with the mother plant. The time to collect samples of a subculture to another was about 120 days. The same procedure was performed on nodal segments exposed to treatment B.

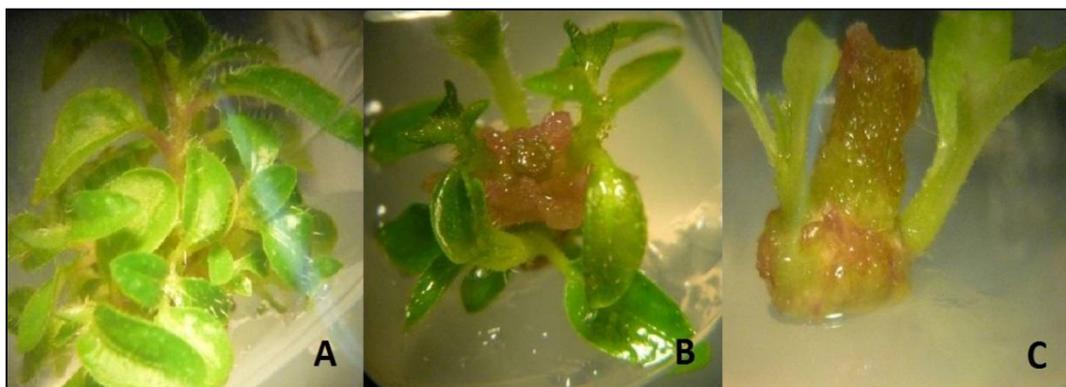


Figure 2. Treatment of nodal segments. A) Somaclones obtained from B5 medium + 0.1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP. B) Somaclones obtained from B5 medium + 0.1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP. C) Somaclones obtained from B5 medium.

Genomic DNA Extraction

DNA was extracted from fresh leaves of 24 micropropagated somaclones and 4 mother plants, these leaves were exposed in liquid nitrogen and crushed in preparation for DNA extraction. We used the kit and protocol of qiagen extraction, DNA quantity was estimated with a nanodrop (Thermo Scientific 2000 C) and each sample was diluted in TE and stored at -20 °C.

ISSR analysis

Six ISSR primers were selected for screening for the PCR standardization. The ISSR PCR was performed in a 20 µl reaction mixture containing 20 ng of template DNA, 4 µl PCR buffer 5X, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM of primer, 0.2 mM each dNTP and 1 U Taq DNA polymerase (Promega). DNA amplification was performed with thermal cycler (Applied Biosystems, VERITI PCR). The PCR reaction program consisted of: one cycle at 94 °C, 4 min; 34 cycles at 94 °C, 30 s; annealing 45 s, the annealing temperature depended of each primer and 72 °C, 2 min; one cycle at 72 °C, 10 min. The amplification products were resolved by electrophoresis on 2% agarose gel with 1X TAE, stained with GelRed Nucleic Acid Stain and visualized under UV light. The size of the amplification products

were estimated for a 100 pb ladder (Invitrogen).

The presence (1) and absence (0) of bands between samples was scored in amplified DNA of micropropagated plants along with the respective donors. Bands with the same mobility were counted as identical bands. DNA bands of low visual intensity that were difficult to be distinguished as present or absent were considered ambiguous markers and were not scored (Figure 3). In all the reactions only the consistently reproducible bands were taken into account. Genetic similarities were measured by the Jaccard's similarity coefficient and an analysis of variance (ANOVA) between treatments and between crop cycles and applied the Tukey's test to determine significant differences, using language R 2.12.2. version.

Results and Discussion

ISSR analysis of the mother plants and nodal segments revealed a total of 59 clear and reproducible bands of 6 primers used for amplification, with an average of 10 bands primer (range 8-15 bands), a minimum of 8 bands were observed in the primers 834, 836 and 840 and a maximum of 15 bands in the primer 808, with a size of 160 to 2632 bp (base pairs) the band of 160 bp for primer 836 and of 2632 bp for primer 840 (Table 1).

Table 1. Monomorphic and polymorphic bands. Number of bands producer by primer (BPP) and number of polymorphic bands (PB) of each treatment. The concentration of growth regulators are in mg/l.

Primer	Tm (°C)	A		B		Control		Range bp
		BPP	PB	BPP	PB	BPP	PB	
807	42	11	-	11	1	11	2	294-1545
808	42	15	9	14	8	15	1	739-2592
809	42	9	1	8	2	9	2	314-1432
834	48	8	-	8	-	8	-	344-2471
836	45	8	-	8	-	8	-	160-874
840	48	8	1	8	-	8	1	215-2632
Total		59	11	57	11	59	6	215-2632

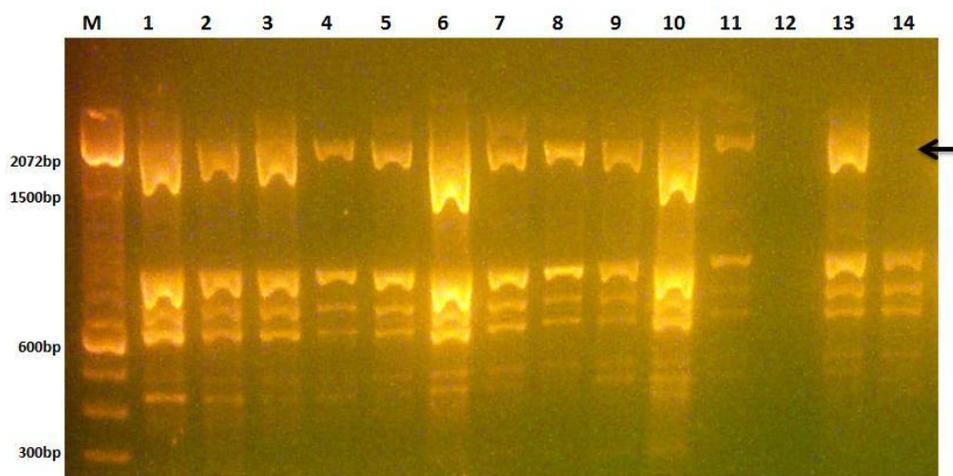


Figure 3. ISSR profiles of nodal segments and mother plants generated by primer 834. Polymorphic DNA band is indicated by arrow lane 14. Absence of bands is observed in lane 12. Lanes 1 and 8, mother plants; lanes 2-7 and 9-14, nodal segments obtained from mother plants; Lane M, molecular marker indicated in 100 bp.

To evaluate the effect of growth regulators was taken into account the first sub-cultures because at this point the nodal segments were in direct contact with the growth regulators (Figure 1). The study showed that treatment with the highest percentage of somaclonal variation was treatment with the most amount of growth regulators B (0.1-1.0BAP NAA) with respect to treatment A (Table 2). It has been shown that plant growth regulators applied to the culture medium can cause genetic changes [6]. Sivanesan [10] found

that in concentrations of 2.0 mg/l BAP generate 63% of somaclonal variation compared to 47.5% and 28.7% produced by the concentration of 1.5 mg/l and 1.0 mg/l BAP respectively. Similarly Kochieva et al. [11] Reported that increasing concentrations of growth regulators cause most genetic changes.

Genetic variation was increasing in each culture cycle and is most noticeable in the third culture cycle between treatments, in our

study we expected to get since the first culture cycle differences noticeable, which make us think of a mechanism of response from the genotypes of the nodal segments, in stress conditions, to this fact we add that there may have been by residual effect of growth regulators [12].

Although statistically using Tukey's test, do not have significant differences the treatments and culture cycles compared with induced genetic changes (Table 2).

Table 2. Percentage of somaclonal variation of nodal segments of the three treatments influenced by the three sub-cultures. Data are expressed as mean \pm standard error of genetic distance. Media identified by the same letter "a" are not significantly different ($p \leq 0.05$) using Tukey's test. A, B, C (treatments) R1, R2, R3 (culture cycles).

Culture Cycles	% Somaclonal variation
Mother Plant	0 \pm 0 a
AR1	12 \pm 0,14 a
AR2	24,15 \pm 2,1 a
AR3	37 \pm 9,4 a
BR1	12,25 \pm 14,64 a
BR2	25,9 \pm 11,59 a
BR3	42,5 \pm 9,7 a
CR1	13,22 \pm 9,7 a
CR2	25,3 \pm 17,64 a
CR3	34,3 \pm 21,1 a

In our study we found that rise concentrations of BAP somaclonal variation increases, so that at 0.5 mg/l have a percentage of 37% while increasing the concentration of 1 mg/l this increased to 42.5% of somaclonal variation at the end of cultivation (Figure 4), and has been shown that generally the addition of BAP into the culture medium at high concentrations are the cause of genetic instability [13]. However low levels of this cytokinine to 0.5 mg/l reduced the vitrification and the probability of generating somaclonal variation in *Caragana fruticosa*, giving notice that the same concentration of this hormone increases or

decreases the somaclonal variation depending of some of the species studied [14].

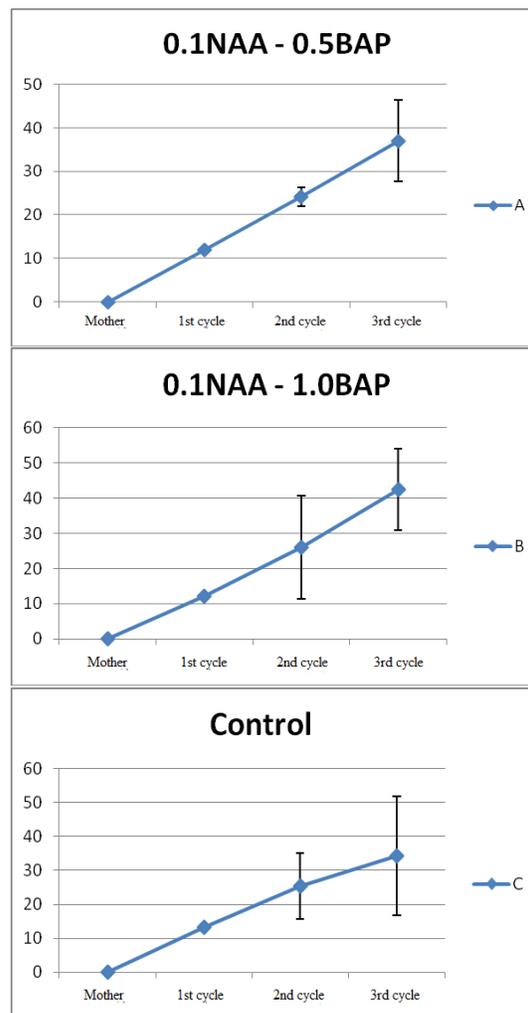


Figure 4. Comparison of three treatments: increase of variation across the three sub-cultures.

Crop cycles had an influence on genetic stability in the nodal segments culture of *C. officinalis*, from the first culture cycle compared to the work done by Jambhale et al. [15], where the influence of culture cycles was reflected after the eighth cycle, and a growth retardation after the fourteenth cycle, in contrast to the works reported by Ladyzynski et al. [16], and Mondal and Chand [17], where crop cycles did not affect the genetic stability of micropropagated plants.

Apart of the growth regulators and crop cycles evaluated, there are other factors that may intervene in the genetic changes generated, some authors relate to the type and rate of genetic variation with the interaction of genotype and in vitro culture environment [18]. For example Bennici et al. [19] Suggest a possible genotypic effect due to the absence of genetic variation that was observed after a period of seventeen months in micropropagated plants of fennel, however in *C. officinalis* genetic variation was found after four months of culture.

Besides the possibility of producing stress-induced mutations like in the study conducted by Bindiya et al [20], In which the environment of the in vitro culture can be mutagenic and the regenerated plants may show phenotypic a/o genotypic variations. To this fact we add that, when the segments are cultivated by seeds, show different genotypes for each individual [21].

Although there is presence of *Cinchona officinalis* somaclonal variation in treatment and control, this percentage is low compared to those determined in other species influenced by the type of regeneration and callus formation, organogenesis, suspension cultures etc, relating to study conducted by Rathore et al [22]. , Who showed in their studies a high frequency of somaclonal variation of 86.6% in a culture of *Aloe vera* L., in this way can provide vegetable material that can be used in programs reintroduction into the environment.

Acknowledgements

To the Instituto de Ecología of the Universidad Técnica Particular de Loja, all staff working in this institute specially to Ing. Rosa Armijos.

References

1. Andersson, L y Taylor, C. 1994. "Rubiaceae-Cinchoneae-Coptosapeltea". En: Harling G.Andersson L (Eds), Flora of Ecuador

- n° 50. Council for Nordic Publications in Botany. Museo Botánico. Dinamarca, Pág. 114.
2. Nieto, M. 2000. Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo. ICAH. Pág. 184-232.
3. Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez, S y Jorgensen, P. 2000. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, EC. Pág 489.
4. Garmendia, A. 2005. El árbol de la Quina (*Cinchona spp.*) Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura, 1ra ed. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, EC. Pág. 33-155.
5. Rout, G.R., Das, P.: In vitro studies of ginger: a review of recent progress. – In: Goril, J.N., Anand Kumar, P., Singh, V.K. (ed.): Recent Progress in Medical Plants. Vol. 4. Biotechnology and Genetic Engineering. Pp. 307-326. Studium Press, Houston 2002.
6. Sahijram L, Soneji JR & Bollamma KT (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 39: 551-556.
7. Cardone, S., Olmos, S y Echenique, V. 2004. Variación somaclonal. In Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTA, Argentina. Pág.81-96.
8. Devarumath RM, Nandy S, Rani V, Marimuthu S, Muraleedharan N, Raina SN (2002) RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica spp. assamica* (Assam type) Plant Cell Rep 21: 166-173.
9. Ge S (2001) Application of DNA molecular marker in conservation biology. In: Zou YP, Ge S, Wang XD (eds) Molecular marker in systematic

- and evolutionary botany. Science Press, Beijing, pp 140-149.
10. Sivanesan, I. 2007. Shoot regeneration and somaclonal variation from leaf callus cultures of *Plumbago zeylanica* Linn. Asian J. Plant Sci 6:83–86.
 11. Kochieva, E.Z., Khussein, I.A., Legkobit, M.P y Khadeeva N.V. 2002. The detection of genome polymorphism in *Stachys* species using RAPD. Russian Journal of Genetics. 38(5):516-520.
 12. Ramírez-Serrano C. & Soltero-Quintana R. 2007. Optimización de la Micropropagación de cactus mediante la estimulación de aréolas dormantes en *Turbinicarpus pseudo macrochele*, *Mammillaria geminispina* y *Echinocereus viridiflorus*. México.
 13. Peddaboina, V., Thamidala, C y Karampuri S. 2006. *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. Sci. Hort. 107:117-122.
 14. Xiao-jie, Z., Ling Y y Hai-long, S. 2011. Shoot multiplication and plant regeneration in *Caragana fruticosa* (Pall.) Besser. Forestry Research. 22(4): 561–567.
 15. Jambhale, N.D., Patil, S.C., Jadhav, A.S., Pawar, S.V y Waghmode, B.D. 2001. Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones. Infomusa 10(1):38–39.
 16. Ladyzynski, M., Burza, W y Malepszy, S. 2002. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. Euphytica 125:349–356.
 17. Mondal, T.K y Chand, P.K. 2002. Detection of genetic variation among micropropagated tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] by RAPD analysis. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38:296–299.
 18. Martin, K., Pachathundikandi, S., Zhang, C., Slater, A., Madassery, J. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp.*) cv. Grande naine and its propagation via shoot tip culture. In Vitro Cell Dev Biol Plant 42:188–192.
 19. Bennici, A., Anzidei, M., Vendramin, G.G. 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant Sci 166:221–227.
 20. Bindiya, K., Kanwar, K. 2003. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudo acacia* L. Euphytica 132:41-47.
 21. Orbovic, V., Calovic, M., Vilorica, Z., Nielsen, B., Gmitter, F., Castle, W., Grosser J. 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. Euphytica 161:329–335.
 22. Rathore, M.S., Chikara, J., Mastan, S.G., Rahman, H., Anand K.G.V y Shekhawat N.S. 2011. Assessment of Genetic Stability and Instability of Tissue Culture-Propagated Plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR Markers. Appl Biochem Biotechnol 165:1356–1365.

RESUMEN

Cinchona officinalis es una especie endémica del valle de Loja - Ecuador, esta ha sido catalogada como amenazada debido a la extracción exagerada de su corteza con fines medicinales entre los siglos XVIII - XIX. El objetivo de este estudio fue determinar la variación somaclonal en cultivos de segmentos nodales de *C. officinalis*, cultivados en medio Gamborg (1968) con dos distintas combinaciones hormonales: 0.1NAA-0.5 BAP (A) y 0.1NAA-1.0 BAP (B). Para estimar las diferencias genéticas, los somaclones fueron comparados con sus correspondientes plantas madre y con el uso de marcadores ISSR. Se encontró variación somaclonal en los tratamientos evaluados, con una media estimada de 42.5% para (B) y 37% para (A). La variación somaclonal también se vio afectada por los ciclos de cultivo, comenzando en el primer ciclo, con diferencias observadas en los tratamientos (A) y (B) y medio B5 (C) en el tercer sub-cultivo.

Palabras clave: Variación Somaclonal, cultivo de segmentos nodales, NAA, BAP, somaclones

Siglas:

ISSR - Inter-Microsatélite;

NAA –Ácido α -Naftalen Acético;

BAP – 6-Bencilaminopurina;

B5 – Medio Gamborg (1968).

ABSTRACT

Cinchona officinalis is an endemic species of the valley of Loja - Ecuador. This has been categorized as threatened between the XVIII - XIX century due to the over-extraction of its peel for medical uses. The purpose of this research was to determine the somaclonal variation in cultures of nodal segments of *C. officinalis*, cultivated in Gamborg medium (1968) with two different hormonal combinations 0.1NAA-0.5 BAP (A) and 0.1NAA-1.0 BAP (B). To estimate the genetic differences, the somaclones were compared with their corresponding mother plants with the help of the ISSR markers. Somaclonal variations were detected in the evaluated treatments, averaging approximately 42.5% in (B) and 37% in (A). The Somaclonal variation was also affected by the culture cycles, beginning in the first cycle, with differences observed in treatments (A) and (B), and B5 medium (C) in the third subculture.

Keywords: Somaclonal Variation, nodal segments culture, NAA, BAP, somaclones

Abbreviations:

ISSR – Inter simple sequence repeats;

NAA – α -Naphthaleneacetic Acid;

BAP – 6-Benzylaminopurine;

B5 – Gamborg medium (1968).

1. OBJETIVOS:

1.1. GENERAL

- Determinar la Variación Somaclonal con ISSRs en Cultivos de Segmentos Nodales de *Cinchona officinalis*, Linneo.

1.2. ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre cambios genéticos en cultivos de segmentos nodales.
- Evaluar el efecto de los ciclos de cultivo sobre cambios genéticos en cultivos de segmentos nodales.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades de *Cinchona officinalis*

Las quinas o cascarillas son especies del género *Cinchona*, se distribuyen a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes desde los 12° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur ¹. En los bosques de Cajanuma y Uritusinga ubicados en la provincia de Loja se explotó la cascarilla hasta el siglo XIX, debido a sus propiedades medicinales por el contenido de metabolitos secundarios (alcaloides) en su cáscara ², según algunos autores la extracción exagerada de los árboles y la modificación del hábitat, han dado como resultado que algunas de las especies del género en especial *C. officinalis* sean catalogadas como amenazadas ³.

Dentro de este género existen especies endémicas localizadas en pequeñas áreas geográficas, como *Cinchona officinalis* (Figura 1), que solo se encuentra en el valle de Loja, al sur de Ecuador ^{1,4}. Los lugares donde se encuentra ésta especie son adecuados para la germinación y desarrollo de las plántulas ya que estos presentan condiciones específicas para la planta ⁴.

¹ Andersson, L y Taylor, C. 1994. "Rubiaceae-Cinchoneae-Coptosapelteae". En: Harling G, Andersson L (Eds), Flora of Ecuador n° 50. Council for Nordic Publications in Botany. Museo Botánico. Dinamarca, Pág. 114.

² Nieto, M. 2000. Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo. ICAH. Pág. 184-232.

³ Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez, S y Jorgensen, P. 2000. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, EC. Pág. 489.

⁴ Garmendia, A. 2005. El árbol de la Quina (*Cinchona spp.*) Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura, 1ra ed. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, EC. Pág. 33-155.

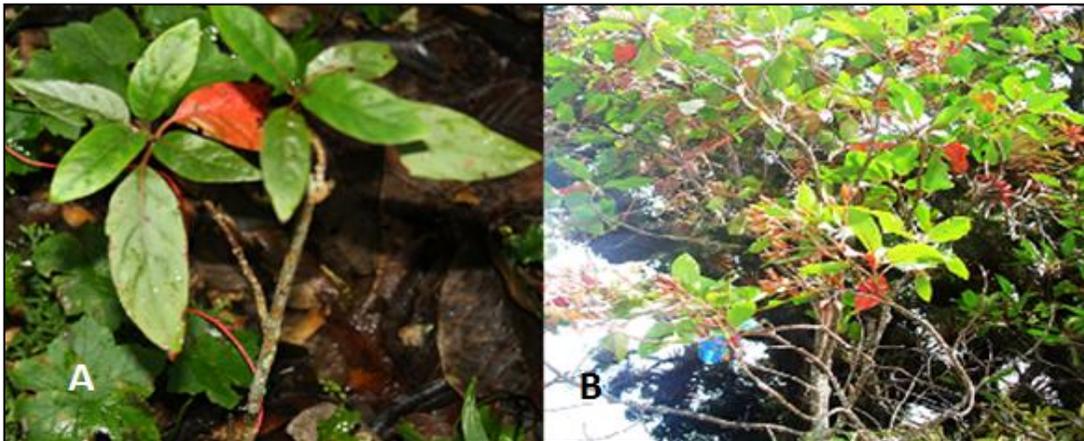


Figura 1. Planta de *Cichona officinalis*. A) Plántula. B) Árbol. (González, 2009)

2.2. Cultivo *In vitro* como Método de Propagación y Conservación

Para la propagación masiva y conservación de germoplasma de individuos de especies amenazadas se ha empleado en los últimos años técnicas de cultivo *in vitro*⁵. Al ser el cultivo *in vitro* una estrategia de conservación de especies amenazadas, esta permite la reforestación de plantas regeneradas a su hábitat natural⁶. La micropropagación origina nuevas estructuras como órganos o embriones, originados a partir de explantos de la planta donadora⁷.

En el cultivo *in vitro* la aplicación de reguladores de crecimiento y frecuentes subcultivos en forma indefinida, pueden influir sobre la estabilidad genética de los somaclones⁸. El sistema de cultivo elegido para la presente investigación es el cultivo por segmentos nodales; varios estudios indican que la frecuencia de variación somaclonal de las plantas regeneradas por medio de este sistema es

⁵ Murch, S., Krishnaraj, S y Saxena, P. 2000. Phytochemicals Mass production. Standardization and conservation. En Sujatha G, Ranjitha B. Effect of Phytohormones on micropropagation of *Artemisia vulagris* L. Acta Physiol Plant. 29:189-195.

⁶ Rout, G.R y Das, P. 2002. *In vitro* studies of ginger: a review of recent progress. – In: Goril, J.N., An and Kumar, P., Singh, V.K. (ed.): Recent Progress in Medical Plants. Vol. 4. Biotechnology and Genetic Engineering. Pág. 307-326. Studium Press, Houston.

⁷ Prieto, H., Jordan, M., Barreto, P., Cordeiro, M y Durzan, D. 2005. Biotecnología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura, Chile.

⁸ Sahijram, L., Soneyi, JR y Bollamma, KT. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 39: 551–556.

baja frente a valores elevados de variabilidad de otros sistemas de regeneración como callogénesis, organogénesis, cultivos en suspensión, etc ^{8,9}.

Por lo mencionado anteriormente, se hace necesario considerar a la especie *Cinchona officinalis* L. como prioritaria para su conservación y estudio, sobre todo en lo que se refiere a métodos de propagación y determinación del grado de variación genética que puede ocurrir en condiciones *in vitro*, tomando en cuenta a los ciclos de cultivo y reguladores de crecimiento como factores que puedan producir cambios genéticos en la especie ⁶. Siendo importante el presente estudio de variabilidad genética para obtener material vegetal apto para utilizarlo en programas de reintroducción al medio ambiente y el establecimiento de plantaciones para la obtención de extractos metabólicos ⁶.

2.3. Variación Somaclonal

Se entiende como variación somaclonal a los cambios genéticos que se producen cuando individuos vegetales son sometidas a cultivo *in vitro* ¹⁰. La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no ¹¹, siendo no heredables cuando son de tipo epigenético a causa del cambio transitorio en nivel de expresión génica. Hay que considerar que los factores genéticos y epigenéticos de la variación somaclonal, no son independientes como se creía ¹², es decir que cuando ocurren cambios a nivel del ADN también pueden producirse cambios en el nivel de metilación del ADN.

La variación somaclonal puede tener un origen nuclear y/o citoplasmático:

2.3.1. Origen Nuclear

⁹ Cardone, S., Olmos, S y Echenique, V. 2004. Variación somaclonal. In Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTA, Argentina. Pág. 81-96.

¹⁰ Larkin, P y Scowcroft, WR. 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

¹¹ Kaeppler, SM., Kaeppler, HF y Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43: 179-188.

¹² Comai, L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. Plant Molecular Biology. 43(2-3):387-399.

Afectan al número y/o estructura de los cromosomas ^{13,14}.

Cuando hay alteraciones génicas que inciden sobre caracteres cualitativos, en el cual intervienen un locus o pocos loci y las que producen alteración en caracteres cuantitativos con la intervención de muchos loci ¹⁵.

Incide en las alteraciones referidas al nivel de metilación, éste tipo de alteraciones que aunque producen cambios en la secuencia de nucleótidos y debido a esto no son consideradas como cambios genéticos como tal, sí parecen heredarse, durante algunos sub-cultivos ¹⁶.

Y en los fenómenos de transposición ¹⁷, que es el cambio de posición de determinados pares de bases en la secuencia de ADN dentro del genoma que se produce por un mecanismo de corte y pegado.

2.3.2. Origen Citoplasmático

Se producen por cambios en el ADN de mitocondrias o de cloroplastos, que son los principales sitios celulares de formación de ATP durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria y la fotosíntesis en los cloroplastos ¹⁸.

2.4. Factores que influyen en la Variación Somaclonal

Existen varios factores que influyen en la estabilidad genética de plantas en la práctica del cultivo *in vitro*, Venkatachalam et al. ¹⁹, indican que la variación

¹³ Choi, H.W., Lemaux, P.G. y Cho, M.J. 2000a. High frequency of cytogenetic aberration in transgenic oat (*Avena sativa* L.) plants. *Plant Science*. 156(1):85-94.

¹⁴ Choi, H.W., Lemaux, P.G. y Cho, M.J. 2000b. Increased chromosomal variation in transgenic versus non transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Crop Science*. 40(2): 524-533.

¹⁵ Hawbaker, M.S., Fehr, W.R., Mansur, L.M., Shoemaker, R.C. y Palmer, R.G. 1993. Genetic variation for quantitative traits in soybean lines derived from tissue culture. *Theoretical y Applied Genetics*. 87(1-2):49-53.

¹⁶ Finnegan, E.J. y Kovac, K.A. 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology*. 43(2-3):189-201.

¹⁷ Agrawal, G.K., Yamazaki, M., Kobayashi, M., Hirochika, R., Miyao, A. y Hirochika, H. 2001. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion. Tagging of a zeaxanthineoxidase gene and a novel OsTATC gene. *Plant Physiology*. 125(3): 1248-1257.

¹⁸ Rani, V y Raina, S.N. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical reappraisal. *In vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*. 36(5):319-330.

somaclonal puede verse afectada por: el explanto inicial, las condiciones del cultivo *in vitro* y el genotipo de la especie.

2.4.1. El genotipo

Los genotipos de diferentes especies pueden responder de diferente manera cuando son expuestos en cultivo *in vitro*²⁰. Por tal motivo existen especies que presentan una frecuencia de variación baja, frente a otras que pueden presentar una frecuencia elevada. Además la ploidía del explanto de partida también puede influir sobre la frecuencia y el tipo de cambios genéticos generados en el tejido cultivado *in vitro*^{18,21,22}.

2.4.2. Vía de regeneración y tipo de explanto.

La elección del sistema de regeneración puede ser un factor muy importante en la estabilidad genética²³, sobre todo estudios citológicos indican una frecuencia elevada de variación en plantas regeneradas de protoplastos frente a plantas que han sido regeneradas directamente de otros explantos²⁴.

Como es lógico la frecuencia de variabilidad aumentaría con el grado de desdiferenciación y desorganización de los tejidos por los que pasa el cultivo *in vitro*, es decir cuando un tejido altamente diferenciado pasa por una etapa de desdiferenciación con una alta tasa de división celular, se puede generar mayor variación somaclonal que cuando ocurre un desarrollo directo a partir de yemas

¹⁹ Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V y Bhagyalakshmi, N. 2007c. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. *Plant Growth Regulators*. 51:193–205.

²⁰ Etienne, H y Bertrand, B. 2003. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol* 23:419–426.

²¹ Limanton-Grevet, A., Sotta, B., Brown, S y Jullien, M. 2000. Analysis of habituated embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L.: growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli and regenerated plants. *Plant Science*. 160(1):15-26.

²² Ochatt, S.J., Mousset-Declas, C y Rancillac, M. 2000. Fertile pea plants regenerate from protoplasts when calluses have not undergone endoreduplication; *Plant Science*. 156(2):177-183.

²³ Saito, A y Suzuki, M. 1999. Efficient shoot-regeneration from calli of apple rootstock [*Malus x prunifolia* var. ringo Asami Mo84-A] and cultivar [*Malus x domestica* cv. Fujii]. *Journal of Plant Physiology* 155(4-5):620-624.

²⁴ Lee, S.H., Shon, Y.G., Kim, C.Y., Chun, H.J., Cheong, Y.H., Kim, Z.H., Choe, Z.R., Choi, Y.J y Cho, M.J. 1999. Variations in the morphology of rice plants regenerated from protoplasts using different culture procedures - Protoclonal variation of protoplast-derived rice plants. *Plant Cell Tissue y Organ Culture*. 57(3):179-187.

apicales o axilares y embriones ^{8,9}. Tomando en cuenta lo anterior, el cultivo de meristemas aislados y de yemas serían los sistemas más estables a los que seguirían, por este orden, la embriogénesis somática, la organogénesis directa, la regeneración a partir de callos, de suspensiones celulares y por último el de protoplastos. Sin embargo hay que tener en cuenta que pueden existir excepciones ¹⁸.

2.4.3. Duración del cultivo y sub-cultivos.

Varios estudios demuestran que la frecuencia de mutaciones producidas por el cultivo *in vitro*, parece aumentar en cultivos envejecidos y en plantas con varios sub-cultivos ⁹, algunos autores mencionan que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho sub-cultivos, en el caso de diferentes variedades de banano ⁸.

2.4.4. Composición del medio de cultivo.

En cultivos, a largo plazo, de arroz ²⁴, y espárrago ²¹, realizados en medios con distintas concentraciones de auxinas y citoquininas, evidenciaron cambios genéticos. Principalmente los reguladores de crecimiento de tipo auxínico, pueden promover la metilación del ADN, produciendo cambios epigenéticos ^{8,25}. A su vez alguno de los elementos minerales del medio también puede afectar a la estabilidad genética del material cultivado *in vitro* ²⁶.

2.4.5. Factores físicos

El estado físico del medio de cultivo (líquido o sólido) también puede influir en la aparición de variantes somaclonales, ya que un mismo tejido se comporta de

²⁵ Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 1111–1120.

²⁶ Lutts, S., Kinet, J.M. y Bouharmont, J. 1998. NaCl impact on somaclonal variation exhibited by tissue culture-derived fertile plants of rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Physiology. 152(1):92-103

diferente manera frente a los factores físicos asociados (oxigenación, tensión superficial y daños mecánicos). Por ejemplo, una deficiencia en la oxigenación del callo causa la producción de etanol que puede actuar como mutágeno⁹. También se ha encontrado que en explantos de piña (*Ananas comosus* cv. Amarelinho) cultivados en un sistema de inmersión temporal (medio líquido), presentan tasas mayores de variación somaclonal que en cultivos de medios semisólidos²⁷.

2.5. Técnicas empleadas en el estudio de la variación somaclonal

La detección de cambios genéticos se lo puede hacer al comparar las diferencias entre el fenotipo y/o genotipo del material de partida y el material obtenido del cultivo *in vitro*⁹.

La variación somaclonal puede ser detectada por diversos tipos de marcadores morfológicos, tales como: estudio del cariotipo (análisis citológico), tamaño, color de las flores, forma de la hoja, etc²⁸, marcadores isoenzimático, que son enzimas específicas, que tienen la misma actividad, pero con diferente estructura molecular²⁹; los basados en proteínas de reserva de las semillas³⁰ y aquellos marcadores basados en el ADN³¹.

2.5.1. Marcadores Morfológicos

Los caracteres morfológicos como color tamaño y forma de las partes de la planta, han sido usados para detectar variantes en el cual pueden ser fácilmente

²⁷ Feuser, S., Meler, K., Daquinta, M., Guerra, M.P y Nodari, R.O. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 221–227.

²⁸ Mehta, Y.R y Angra, D. 2000. Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 23: 617-622.

²⁹ Seo, B.B., Do, G.S y Devi, J. 2004. Chromosomal and molecular analysis of somaclonal variation in certain *Allium* species. In: Mujib, A., Myeong-je, C., Predieri, S., Banerjee, S. eds. *In vitro* application in crop improvement. Enfield, EUA, Science Publishers. Pág. 79-102.

³⁰ Campa, A., Pérez, E., Giráldez, R y Ferreira, J.J. 2004. Utilización de las proteínas de semilla como marcadores genéticos para la caracterización de la colección de judías del Serida. *Actas de Horticultura* 41: 313–316

³¹ Picca, A., Helguera, M., Salomón, N y Carrera, A. 2004. Marcadores moleculares. In Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. eds. *Biología y mejoramiento vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina, Ediciones INTA. Pág. 61-68.

detectados, sin embargo este método puede acarrear con algunos inconvenientes, por ejemplo estos caracteres morfológicos frecuentemente son influenciados por factores ambientales y no podrían reflejar si en realidad son cambios genéticos como tal ³².

El análisis cariotípico ha sido utilizado para identificar reordenamientos y/o alteraciones numéricas en los cromosomas de las plantas variantes ³³. Ésta técnica presenta algunas dificultades como sucede en especies que tienen cromosomas muy pequeños y/o muy numerosos. Para la localización de determinados cromosomas y las posibles variaciones que puedan producirse, se puede utilizar hibridación *in situ*, de determinados genes ³⁴.

2.5.2. Proteínas e Isoenzimas

Los análisis de proteínas totales e isoenzimas pueden utilizarse para la detección de modificaciones bioquímicas. Teniendo en cuenta que este método presenta algunas desventajas como el número de marcadores disponibles que es muy pequeño y se restringe a los genes que codifican para determinadas proteínas solubles y además los patrones isoenzimáticos son afectados durante el desarrollo y por el ambiente ³⁵.

2.5.3. Marcadores moleculares basados en ADN

³² Zaid, A y Al Kaabi, H. 2003. Plant-off types in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Emirates J Agric Sci 15:17–35.

³³ Al Zahim, M.A., Ford Lloyd, B.V. y Newbury, H.J. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Reports, 18(6): 473-477.

³⁴ Do, G.S., Seo, B.B., Ko, J.M., Lee, S.H., Pak, J.H., Kim, I.S. y Song, S.D. 1999. Analysis of somaclonal variation through tissue culture and chromosomal localization of rDNA sites by fluorescent *in vitro* hybridization in wild *Allium tuberosum* and a regenerated variant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 57(2): 113-119.

³⁵ Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V y Bhagyalakshmi, N. 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of bananas using RAPD and ISSR markers. Electron J Biotechnol 10:1–8.

Los marcadores moleculares basados en ADN se refieren a fragmentos de ADN que muestran polimorfismos, localizándose éstos en una región codificante o no codificante, revelando cambios génicos entre dos o más genomas ^{31,36,37}.

Los marcadores genéticos de ADN han ido ganando terreno en los análisis de variación somaclonal ya que permiten un acceso directo a todo el genoma de los individuos analizados ^{38,41,42} evaluándolos de una manera más efectiva ^{8,39,40,41}.

Para su aplicación, el ADN extraído es digerido por enzimas específicas ⁴², también se puede amplificar regiones del ADN utilizando cebadores, o combinando ambas técnicas ^{8,43}. Los resultados son visualizados con luz U.V. como bandas en un gel ⁴⁶.

Para el estudio de la variación somaclonal se puede aplicar la citometría de flujo como sistema rápido y eficaz para detectar variaciones en el contenido de ADN nuclear ⁴⁴. Sin embargo tenemos que considerar que ésta técnica no puede ser tan fiable cuando se trata de identificar pequeñas variaciones en el contenido de ADN nuclear ⁴⁵.

2.5.3.1. Marcadores basados en hibridación del ADN o RFLP (*Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción*)

³⁶ Palombi, M.A y Damiano, C. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). Plant Cell Reports 20: 1061–1066.

³⁷ Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de Marcadores Moleculares en plantas., aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17: 221–242.

³⁸ Agarwal, M., Shrivastava, N y Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Reports 27: 617-631.

³⁹ Araújo, L.G., Prabhu, A.S., Filippi, M.C y Chaves, L.J. 2001. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC47 for genetic divergence. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 165–172.

⁴⁰ Cassells, C.A y Curry, R.F. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 145–157.

⁴¹ Patzak, J. 2003. Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. Euphytica 131: 343–350.

⁴² Jaligot, E., Rival, A., Beulé, T., Dussert, S y Verdeil, J.L. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. Plant Cell Reports 19: 684–690.

⁴³ Prado, M.J., González, M.V., Romo, S y Herrera, M.T. 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwi fruit and AFLP analysis of genetic variation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88: 1–10.

⁴⁴ Yanpaisan, W., King, N.J. y Doran, P.M. 1999. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale Bioprocessing. Biotechnology Advances. 17(1):3-27.

⁴⁵ Noirot, M., Barre, P.H., Louarn, J., Duperray, C. y Hamon, S. 2000. Nucleus-cytosol interactions: A source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. Annals of Botany (London) 86(2): 309-316.

Los RFLPs son polimorfismos entre individuos evaluados por el tamaño de los fragmentos que son cortados por enzimas de restricción ⁴⁶. Mediante *Southern blot* se transfieren los fragmentos de ADN separados según su movilidad electroforética a una membrana y luego se hibridan con sondas específicas marcadas radiactivamente ⁴⁷.

2.5.3.2. Marcadores moleculares basados en PCR

La PCR está basada en la síntesis de millones de copias de uno o más fragmentos de ADN. La técnica implica la presencia de una enzima conocida como ADN polimerasa ^{31,48}.

- ***Amplificación aleatoria del ADN polimórfico o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)***

La RAPD consiste en la amplificación de secuencias de ADN con un cebador de una longitud de diez pares de bases con secuencia aleatoria (decámero), que se hibrida con el ADN ⁴³. Esta técnica es simple y efectiva que permite determinar los polimorfismos ⁴⁸.

- ***Región amplificada de una secuencia caracterizada o SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)***

Los SCAR son fragmentos de ADN amplificados por PCR mediante la utilización de cebadores específicos de 15 a 30 pares de bases, diseñados de acuerdo con la secuencia obtenida de marcadores RAPD polimórficos que se desea hacer aún más específicos ^{49,50}.

⁴⁶ Aravanopoulos, FA. 2003. Molecular identification of micropropagated plants. *Acta Horticulturae* 616: 25–47.

⁴⁷ Yadav, P y Tyagi, R. 2006. *Biotechnology of Plant Tissues*. Discovery Publishing House. New Delhi (India). Pág. 189.

⁴⁸ Martín, C., Uberhuaga, E y Pérez, C. 2002. Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica* 127: 247–253.

⁴⁹ Deputy, J.C., Ming, R., Mam H., Liu, Z., Fitch, M.M., Wang, M., Manshardt, R y Stiles, J.I. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 107-111.

⁵⁰ Chaves-Bedoya, G y Núñez, V. 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica* 153: 215–220.

- **Polimorfismo de amplificación sensible a metilación o MSAP (Methylation-sensitive amplification polymorphism)**

Esta técnica se basa en una doble digestión, primero con una enzima sensible a la presencia de sitios de metilación y luego con una enzima insensible a la metilación, después, los fragmentos son ligados a adaptadores en la doble banda y se amplifica la secuencia con cebadores complementarios a éstos y finalmente los productos son separados en un gel de poliacrilamida ⁴⁸. Los niveles de metilación son medidos en columnas de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) ^{46,51,52}.

- **Secuencias simples repetidas, microsatélites o SSR (Short Sequence Repeats)**

Los SSRs son regiones hipervariables que se componen de secuencias de unas pocas pares de bases (uno a cuatro) repetidas muchas veces, de las cuales estas secuencias se amplifican por medio de PCR utilizando cebadores específicos ⁴⁹. Ésta técnica requiere de mucho trabajo debido a que se puede analizar sólo un locus a la vez ³⁹.

- **Sitios Etiquetados por la Secuencia o STS (Sequence Tagged Sites)**

Son otro tipo de microsatélites. Los STS siguen los mismos principios que el procedimiento de los SSR, únicamente los STS se diferencian por la utilización de cebadores de alrededor de 20 pares de bases ⁴⁵.

2.5.3.3. Marcadores mixtos

⁵¹ Kubis, S.E., Castilho, A.M., Vershinin, A.V y Heslop-Harrison, J.S. 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology* 52: 69–79.

⁵² Jaligot, E., Beulé, T., Baurens, F.C., Billotte, N y Rival, A. 2004. Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the “mantled” variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 47: 224–228.

- **Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)**

Esta técnica es una combinación entre RFLP y PCR ³¹ ya que se necesitan dos enzimas de restricción, la unión de adaptadores en ambos extremos y la amplificación de fragmentos de ADN con cebadores específicos, diseñados tomando en cuenta las secuencias de los sitios de restricción de las enzimas y de los adaptadores utilizados ^{31,53}.

2.6. Inter - Microsatélite (ISSR)

Los ISSRs son un tipo de marcador genético que nos permite conocer el grado de variaciones que ocurre en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en muchos genomas.

La longitud de las secuencias de microsatélites frecuentemente son altamente variables entre individuos, relacionado con altas tasas de mutación que sufren en el proceso de replicación del ADN eliminándose o agregándose unidades a la cadena, de esta forma los fragmentos de ADN resultantes del material micropropagado pueden ser diferentes que las del explanto de partida ⁵⁴.

⁵³ Sánchez-Teyer, L.F., Quiróz-Figueroa, F., Loyola-Vargas, V y Infante, D. 2003. Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology* 23: 107–115.

⁵⁴ Wolfe, A. 2000. ISSR Resource. Website: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>

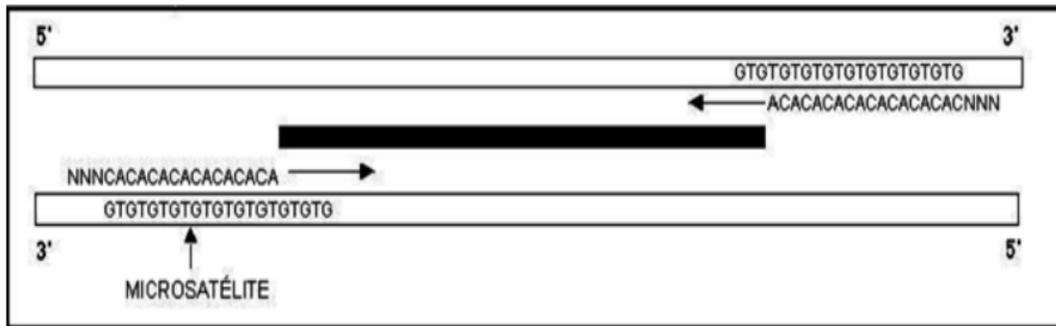


Figura 2. Amplificación con un cebador (CA)_n anclado en el extremo 5' con tres nucleótidos extras. Se amplifica el segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélite en orientación invertida ⁵⁵.

Los ISSRs son marcadores semi-arbitrarios que se amplifican por la presencia de un cebador complementario a un microsatélite, éstos cebadores consisten en un motivo repetido de di o trinucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite ^{56,57}. Los ISSRs pueden ser utilizados como marcadores para distintos problemas biológicos como diferenciar individuos de origen clonal y sexual ^{56,57}.

⁵⁵ González, A y Aguirre, X. 2004. Capítulo 9: Inter Simple Sequence Repeats (ISSRS). Website: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap19.pdf>

⁵⁸ Bornet, B y Branchard, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.

⁵⁷ Pradeep, R., Sarla, N y Siddiq, E. 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1): 9-27.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo *In vitro*

La investigación se la desarrolló a partir de cuatro individuos (plantas madre) obtenidas de semillas germinadas *in vitro* en medio Gamborg (1968) de los cuales dos de los individuos fueron expuestos al tratamiento “A” y dos al tratamiento “B” con su respectivo control (Tabla 1), una vez que éstos alcanzaron aproximadamente 6 cm de longitud se procedió a la extracción del ADN a partir de sus hojas en buen estado fitosanitario y el repique de los segmentos nodales de las plántulas, esto se hizo en tres sub-cultivos (Figuras 3 y 4). Las muestras (hojas) fueron conservadas a -80°C en tubos Ependorf hasta el proceso de extracción de ADN.

Combinación de reguladores de crecimiento (mg/l)
A = Medio B5 + 0.1 NAA + 0.5 BAP
B = Medio B5 + 0.1 NAA + 1.0 BAP
Control = Medio B5

Tabla 1. Concentración hormonal usada en segmentos nodales. 6-Bencil amino purina (BAP) y Acido Naftalénacético (NAA) fueron usados para tratamientos A y B.

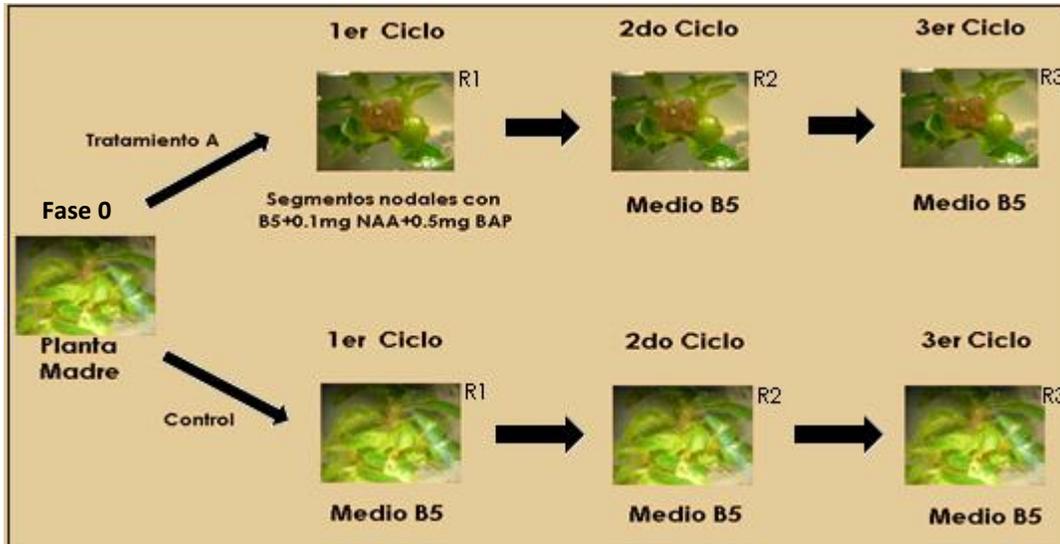


Figura 3. Cultivo *in vitro* y Diseño experimental. Planta madre) Plántula obtenida de una semilla cultivada *in vitro* en medio B5. **1er ciclo)** Segmentos nodales sub-cultivados a partir de la planta madre, sometidos al tratamiento “A” y control, los segmentos del tratamiento “A” fueron cultivados en medio con reguladores de crecimiento durante 60 días. **2do ciclo)** Segmentos nodales sub-cultivados de individuos del 1er ciclo. **3er ciclo)** Segmentos nodales sub-cultivados de individuos del 2do ciclo. Del 1er, 2do y 3ro ciclos del tratamiento “A” y control se tomó una muestra (segmento nodal) por cada uno respectivamente, elegidas al azar para compararlas con la planta madre, el tiempo necesario para que se regeneren los segmentos nodales y obtener las muestras de un sub-cultivo (ciclo) a otro fue de aproximadamente 120 días. El mismo procedimiento se realizó en segmentos nodales expuestos al tratamiento “B”.

3.2. Condiciones de Cultivo *In vitro*

El cultivo de las plantas madres y el posterior cultivo de sus segmentos nodales fueron expuestos a un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad con lámparas fluorescentes de 40 Wats, a una temperatura promedio de 23° C y 65 a 75 % de Humedad relativa.

3.3. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se introdujo los tubos con las hojas en nitrógeno líquido por unos minutos, para facilitar la trituración de las hojas en un molino (Restsch, MM 301), una vez trituradas las hoja se usó el kit y protocolo de extracción de Qiagen, ya extraído el ADN de las muestras, se cuantificó el ADN en

un Nanodrop (Thermo Scientific 2000 C) y fueron diluidas en buffer TE y almacenadas a -20°C.

3.4. Selección de Cebadores ISSR´s

Trece cebadores de The University British Columbia (UBC) (Tabla 2) fueron inicialmente evaluados en las muestras de *C. officinalis* para su posterior selección, teniendo en consideración la amplificación de bandas claras, reproducibles y el número de bandas (mono y polimórficas) que arrojaba cada cebador en particular. Se trabajó con diferentes temperaturas de alineamiento con cada uno, y además se estandarizó la concentración de reactivos y las condiciones para la PCR.

Cebador	Secuencia
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC
868	GAA GAAGAAGAAGAAGAA
870	TGC TGCTGCTGCTGCTGC

Tabla 2. Secuencia de trece Cebadores evaluados inicialmente.

3.5. Amplificación de PCR

En base a la amplificación de bandas mono y polimórficas finalmente se seleccionaron seis cebadores para la amplificación de productos de las plantas madres y plantas sub-cultivadas. Las amplificaciones fueron hechas con una mezcla de reacción de

20 µl conteniendo:

20ng de templado de ADN,
4µl de buffer con Cloruro de Magnesio 5X,
0.5 µM de cebador,
0.2 mM de cada dNTP y
1 U de Taq polimerasa (Promega).

Las amplificaciones de ADN fueron realizadas en un Termociclador (Applied Biosystems, VERITI PCR) con desnaturalización inicial de 4 minutos a 94° C, seguido por 34 ciclos con desnaturalización por 30 segundos a 94°C, alineamiento 45 segundos, la temperatura de alineamiento dependió de cada cebador (Tabla 3); extensión 2 minutos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Cebador	Temperatura (°C)
807	42
808	42
809	42
834	48
836	45
840	48

Tabla 3. Temperaturas de alineamiento de los cebadores. Seleccionados entre los trece cebadores evaluados inicialmente.

3.6. Electroforesis

Se preparó gel de agarosa al 2% con TAE 1X, los geles fueron teñidos con Gel Red y corridos a 4voltios/cm y visualizados bajo luz UV. Los productos amplificados (bandas) de las PCR que no fueron claras se repitieron y finalmente se tomaron en cuenta solo las bandas claras y reproducibles. El tamaño de los productos de amplificación fueron estimados utilizando un marcador molecular de 100 pares de bases (Invitrogen); para la detección de las bandas se usó el programa *GelAnalyzer 2010a*.

3.7. Análisis de Datos

El polimorfismo en cada locus fue registrado en base a la presencia (1) y ausencia (0) de la amplificación entre las madres y sus regenerantes, las bandas de igual peso molecular y movilidad generadas por el mismo cebador son consideradas del mismo locus.

Las similitudes genéticas fueron calculadas usando el coeficiente de Jaccard. La relación entre las plantas madres y sus regenerantes fue representada en un dendrograma, el cual fue construido basado en los datos de la matriz de distancia genética por aplicación de UPGMA. A demás se realizó un análisis de varianza (*Anova*) entre tratamientos y entre los ciclos de cultivo y se aplicó el test de *Tukey* para determinar diferencias significativas, todo esto utilizando *Lenguaje R* versión 2.12.2

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Cultivo *in vitro*

A partir de las 4 plantas madres se tomaron segmentos nodales que fueron cultivados en los 3 medios de cultivo (Tabla 1), para el primer ciclo de cultivo; para los ciclos 2 y 3 los brotes regenerados a partir de los segmentos nodales fueron sub-cultivados en medio B5 sin hormonas, entre cada ciclo pasaron 4 meses aproximadamente. Teniendo un aproximado de 140 individuos regenerados, con una tasa de multiplicación promedio de 4 individuos/explante, de estos se tomaron 28 individuos (representantes de los dos tratamientos, el control y los 3 ciclos de cultivo con su respectiva madre).

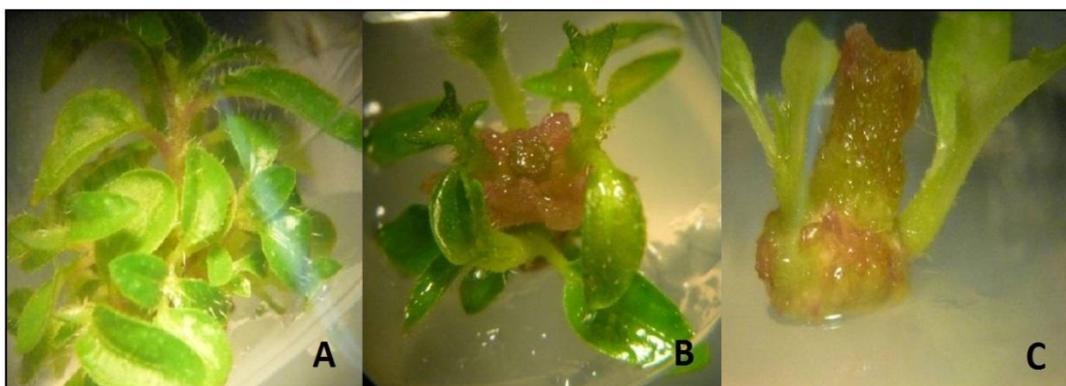


Figura 4. Tratamientos de segmentos nodales. A) Medio B5 + 0.1mg/l de NAA+0.5mg/l de BAP. **B)** Medio B5 + 0.1mg/l de NAA+ 1mg/l de BAP. **C)** Medio B5.

4.2. Cebadores ISSR's

El análisis de ISSR de las plantas madres y segmentos nodales reveló un total de 59 bandas claras y reproducibles de los 6 cebadores usados para la amplificación, con un promedio de 10 bandas por cebador (intervalo de 8-15 bandas), un mínimo de 8 bandas fue observado en los cebadores 834, 836 y 840 y un máximo de 15 bandas para el 808, con un tamaño de 160 a 2632 bp (pares de bases), la banda de 160 bp para el cebador 836 y la de 2632 bp para el cebador 840 (Tabla 4).

Cebador	A		B		Control		Rango bp
	No BPC	No BP	No BPC	No BP	No BPC	No BP	
807	11	-	11	1	11	2	294-1545
808	15	9	14	8	15	1	739-2592
809	9	1	8	2	9	2	314-1432
834	8	-	8	-	8	-	344-2471
836	8	-	8	-	8	-	160-874
840	8	1	8	-	8	1	215-2632
Total	59	11	57	11	59	6	215-2632

Tabla 4. Bandas Monomórficas y Polimórficas. Número de bandas producidas por cebador (No BPC) y número de bandas polimórficas (No BP) de cada tratamiento. La concentración de reguladores de crecimiento está en mg/l.

Se encontraron bandas monomórficas y polimórficas en todos los cebadores empleados, en la figura 5 la flecha indica un locus polimórfico. En algunas de las muestras se obtuvieron bandas con una baja resolución, también ausencia parcial o total de bandas las cuales tuvieron que repetirse.

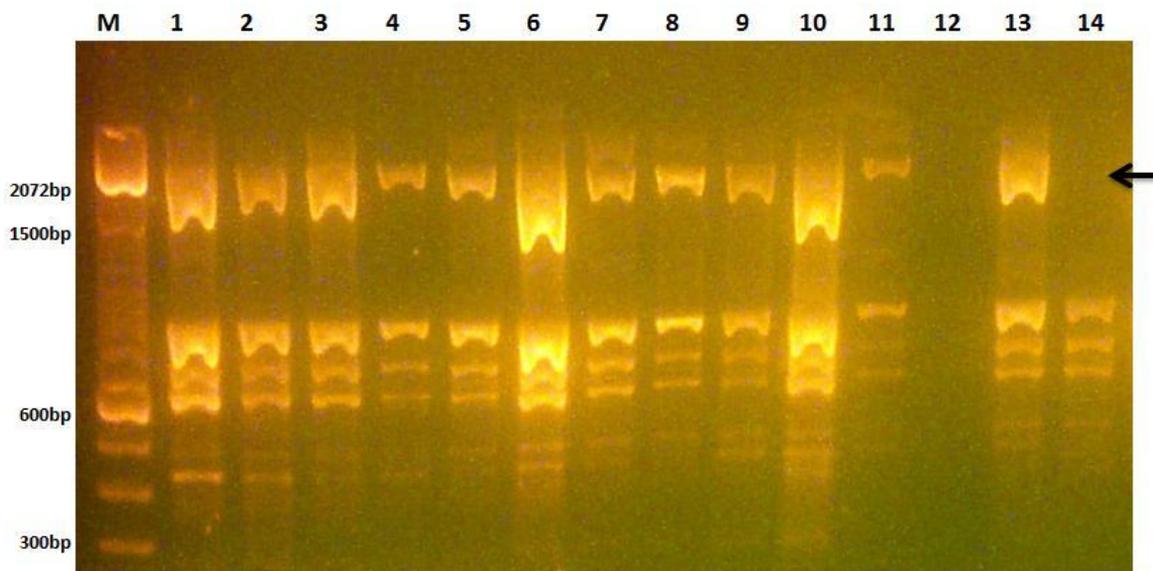


Figura 5. Patrones de ADN después de la amplificación usando el cebador 834. La flecha indica una banda ausente (Polimórfica) carril 14. Bandas ausentes en el carril 12. Carriles 1 y 8 representan las plantas madres, carriles 2-7 y 9-14 representan a los regenerantes de las plantas madres, Carril M indica el marcador molecular de 100 bp.

4.3. Análisis de los Resultados

Los ciclos de cultivo si tuvieron influencia sobre la variación genética desde el primer sub-cultivo en los tratamientos A (0.1NAA-0.5 BAP), B (0.1NAA-1.0 BAP) y Control (medio B5) con relación a su planta madre. Entre los tratamientos del tercer sub-cultivo se producen diferencias en el porcentaje final de variación somaclonal, en el tratamiento A (0.1NAA-0.5 BAP) con 37%, tratamiento B (0.1NAA-1.0 BAP) con 42.5% y Control (medio B5) con 34.3% (Figura 6).

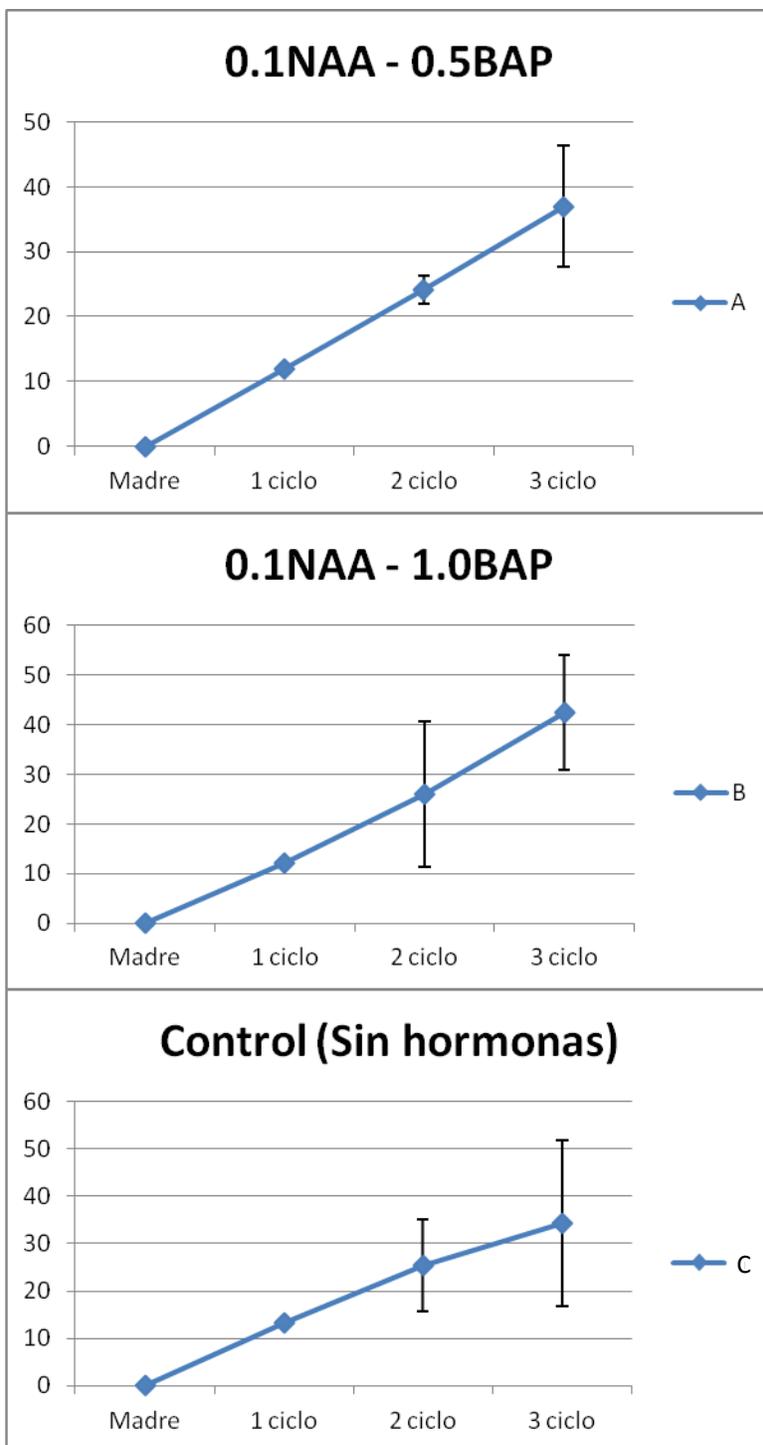


Figura 6. Comparación de los tres tratamientos: incremento de la variación a lo largo de los tres sub-cultivos.

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento se tomó en cuenta el primer sub-cultivo de cada tratamiento incluido el testigo debido a que en este

punto los segmentos nodales estuvieron directamente influenciados por los reguladores de crecimiento (Figura 3). Como resultado sobre la variación somaclonal en el cultivo de segmentos nodales, el tratamiento A (0.1NAA-0.5 BAP) tuvo un 12%, el tratamiento B (0.1NAA-1.0 BAP) 12.25% y el Control (medio B5) nos dio un 13.22% (Tabla 5, resaltado). Aunque estadísticamente aplicando el test de Tukey, no hay diferencias significativas entre los tratamientos y ciclos de cultivo frente a los cambios genéticos provocados (Tabla 5).

Ciclos de cultivo	% de Variación somaclonal
Planta madre	0 ± 0 a
AR1	12 ± 0,14 a
AR2	24,15 ± 2,1 a
AR3	37± 9,4 a
BR1	12,25 ± 14,64 a
BR2	25,9 ± 11,59 a
BR3	42,5 ± 9,7 a
CR1	13,22 ± 9,7 a
CR2	25,3 ± 17,64 a
CR3	34,3 ± 21,1 a

Tabla 5. Porcentaje de la variación somaclonal de segmentos nodales de los tres tratamientos influenciados por los tres sub-cultivos. Datos expresados como media de la distancia genética ± error estándar. Media identificada por la misma letra “a” no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) aplicando el test de Tukey. A,B,C (Tratamientos) R1, R2, R3 (ciclos de cultivo) (figura 3).

El análisis de agrupamiento UPGMA reveló que A (0.1 NAA – 0.5 BAP) y Control (medio B5) están estrechamente relacionados con respecto a B (0.1 NAA-1.0BAP) (Figura 7), mostrando el grado de asociación que existe entre los somaclones con sus plantas madres, revelando por medio del dendrograma que los segmentos del tratamiento B tienen mayor cantidad de variación genética que el tratamiento A (0.1 NAA – 0.5 BAP) y Control (medio B5).

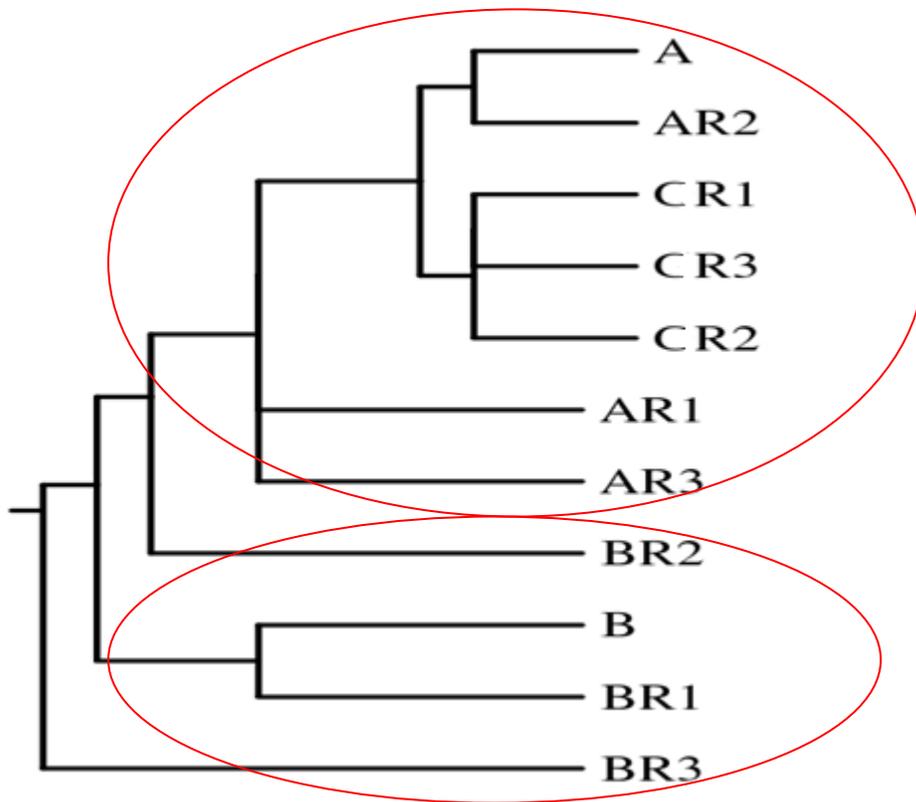


Figura 7. Dendrograma. Basado sobre los índices de similitud de Jaccard mostrando la distancia entre plantas madres y segmentos nodales. A, B, C representan a los tratamientos y R1, R2, R3 a los sub-cultivos o repiques, A y B solas representan a las plantas madres.

El estudio mostró que el tratamiento con relativamente mayor porcentaje de variación somaclonal fue el tratamiento con mayor concentración de reguladores de crecimiento vegetal B (0.1 NAA- 1.0BAP) con respecto al tratamiento A. Se ha evidenciado que los reguladores de crecimiento vegetal aplicados al medio de cultivo pueden generar cambios genéticos^{21,24}. Sivanesan⁵⁸ encontró que en concentraciones de 2.0 mg/l de BAP generan 63% de variación somaclonal con respecto a 47.5% y 28.7% producidos por la concentración de 1.5 mg/l y 1.0 mg/l de BAP respectivamente. De igual manera Kochieva et al.⁵⁹, reportaron que el

⁵⁸ Sivanesan, I. 2007. Shoot regeneration and somaclonal variation from leaf callus cultures of *Plumbago zeylanica* Linn. Asian J. Plant Sci 6:83–86.

incremento de concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal provocan mayor cantidad de cambios genéticos.

La variación genética va incrementando en cada ciclo de cultivo y es más notorio al tercer ciclo de cultivo entre los tratamientos, en nuestro estudio esperábamos obtener desde el primer ciclo de cultivo diferencias, lo que nos hace pensar en un mecanismo de respuesta por parte del genotipo de los segmentos nodales, frente a condiciones de estrés; a esto se le suma que pudo haber existido un efecto residual de los reguladores de crecimiento ⁶⁰.

En nuestro estudio encontramos que al aumentar las concentraciones de BAP la variación somaclonal se incrementa, es así que a 0,5 mg/l tenemos un porcentaje de 37% mientras que al aumentar la concentración a 1mg/l esta aumento a 42,5% de variación somaclonal al final del cultivo, y se ha demostrado que generalmente la adición de BAP al medio de cultivo en altas concentraciones son causantes de inestabilidad genética ⁶¹. Sin embargo las bajas concentraciones de esta citoquinina al 0.5 mg/l redujo la vitrificación y la probabilidad de generar variación somaclonal en *Caragana fruticosa*, dándonos a notar que a una misma concentración de esta hormona puede verse afectada la estabilidad genética de especies en diferentes grados ⁶².

Los ciclos de cultivos tuvieron influencia sobre la estabilidad genética en el cultivo de segmentos nodales de *C. officinalis*, desde el primer ciclo de cultivo en comparación al trabajo desarrollado por Jambhale et al. ⁶³, en donde la influencia de los ciclos de cultivo se vio reflejada luego del octavo ciclo, además de un retraso del crecimiento después del catorceavo ciclo, en contraste a los trabajos

⁵⁹ Kochieva, E.Z., Khussein, I.A., Legkobit, M.P y Khadeeva N.V. 2002. The detection of genome polymorphism in *Stachys* species using RAPD. Russian Journal of Genetics. 38(5):516-520.

⁶⁰ Ramírez-Serrano C. & Soltero-Quintana R. 2007. Optimización de la Micropropagación de cactus mediante la estimulación de aréolas dormantes en *Turbinicarpus pseudo macrochele*, *Mammillaria geminispina* y *Echinocereus viridiflorus*. México.

⁶¹ Peddaboina, V., Thamidalala, C y Karampuri S. 2006. *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. Sci. Hort. 107:117-122.

⁶² Xiao-jie, Z., Ling Y y Hai-long, S. 2011. Shoot multiplication and plant regeneration in *Caragana fruticosa* (Pall.) Besser. Forestry Research. 22(4): 561–567.

⁶³ Jambhale, N.D., Patil, S.C., Jadhav, A.S., Pawar, S.V y Waghmode, B.D. 2001. Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones. Infomusa 10(1):38–39.

reportados por Ladyzynski et al.⁶⁴, y Mondal y Chand⁶⁵, en los cuales los ciclos de cultivo no afectaron la estabilidad genética de las plantas micropropagadas.

Hay que tener en cuenta que además de los reguladores de crecimiento y ciclos de cultivo evaluados, hay otros factores que pudieron intervenir en los cambios genéticos generados, unos autores relacionan al tipo y velocidad de variación genética con la interacción del genotipo y el ambiente de cultivo *in vitro*⁶⁶. Por ejemplo Bennici et al.⁶⁷, sugieren un posible efecto genotípico por la ausencia de variación genética que fue observada después de un periodo de diecisiete meses en plantas micropropagadas de hinojo, no obstante en *C. officinalis* encontramos variación genética a los cuatro meses de cultivo.

Además de la posibilidad de producirse mutaciones inducidas por estrés como en el estudio llevado a cabo por Bindiya et al.⁶⁸, en que el ambiente del cultivo *in vitro* puede ser mutagénico y las plantas regeneradas pueden exhibir variaciones fenotípicas y/o genotípicas⁶⁹, a esto se le suma que los segmentos al ser cultivados por semillas presentan diferentes genotipos para cada individuo, dándonos como resultado que la variación genética podría depender de la respuesta del genotipo de cada individuo frente a las condiciones *in vitro*⁶⁶.

A pesar que existe presencia de variación somaclonal en *Cinchona officinalis* en los tratamientos y en el control, este porcentaje es bajo en comparación a los determinados en otras especies influenciados por el tipo de regeneración como callogénesis, organogénesis, cultivos en suspensión etc, por ejemplo en el estudio

⁶⁴ Ladyzynski, M., Burza, W y Malepszy, S. 2002. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. *Euphytica* 125:349–356.

⁶⁵ Mondal, T.K y Chand, P.K. 2002. Detection of genetic variation among micropropagated tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] by RAPD analysis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:296–299.

⁶⁶ Martin, K., Pachathundikandi, S., Zhang, C., Slater, A., Madassery, J. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp.*) cv. Grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:188–192.

⁶⁷ Bennici, A., Anzidei, M., Vendramin, G.G. 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci* 166:221–227.

⁶⁸ Bindiya, K., Kanwar, K. 2003. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudo acacia*L. *Euphytica* 132:41-47.

⁶⁹ Orbovic, V., Calovic, M., Viloria, Z., Nielsen, B., Gmitter, F., Castle, W., Grosser J. 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161:329–335.

que fue realizado por Rathore et al.⁷⁰, quienes mostraron en sus resultados una elevada frecuencia de la variación somaclonal, de 86.6% en un cultivo de *Aloe vera* L.

⁷⁰ Rathore, M.S., Chikara, J., Mastan, S.G., Rahman, H., Anand K.G.V y Shekhawat N.S. 2011. Assessment of Genetic Stability and Instability of Tissue Culture-Propagated Plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR Markers. Appl Biochem Biotechnol 165:1356–1365.

5. CONCLUSIONES

- En el análisis del efecto de los reguladores de crecimiento sobre el porcentaje de variación somaclonal en el cultivo de segmentos nodales, el tratamiento B (0.1NAA-1.0 BAP) es el más influyente con una media estimada de 12.25%, seguido por el tratamiento A (0.1NAA-0.5 BAP) con 12% de variación somaclonal aunque estadísticamente no son diferentes.
- Al evaluar el efecto de los ciclos de cultivo sobre el porcentaje de variación somaclonal, éstos tuvieron efecto observándose diferencias entre los tratamientos al final del cultivo, en el tratamiento A (0.1NAA-0.5 BAP) con 37%, tratamiento B (0.1NAA-1.0 BAP) con 42.5% y Control (medio B5) con 34.3%.
- Como conclusión final de la presente investigación se presentan resultados donde los niveles de variación somaclonal son bajos en comparación con otros sistemas de regeneración como caulogénesis indirecta y callogénesis (datos no publicados) en *C. officinalis*, de igual manera no se produjeron mayores diferencias entre segmentos nodales sometidos a reguladores de crecimiento y a ciclos de cultivo en contraste con segmentos sin reguladores de crecimiento (control), de ésta manera se asegurar que la técnica usada para la propagación masiva de esta especie puede proveer material vegetal con porcentajes bajos de variaciones genéticas y ser utilizado en programas de reintroducción a su hábitat con fines de conservación y producción.

6. RECOMENDACIONES

- Tener en cuenta que al aumentar el número de sub-cultivos se incrementa el porcentaje de variación somaclonal del cual no se podría obtener material vegetal apto para programas de reintroducción.
- Determinar otro tipo de factor que pueda influir sobre los cambios a nivel genético.
- Evaluar otras vías regenerativas estables como la embriogénesis somática
- Evaluar la eficiencia en la detección de variación somaclonal con otro tipo de cebadores.
- Evaluar si los cambios dado por la variación monoclonal modifican la morfología y funcionamiento de la planta,

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación del medio de cultivo GAMBORG'S B5 (1968), con y sin reguladores de crecimiento

Se utilizó el medio B5 de la casa comercial SIGMA (GAMBORG'S B-5 BASAL MEDIUM WITH MINIMAL ORGANICS), a este medio se lo suplemento con (g dm^{-3}) 10 myoinositol; 0,2 glycina; 0,05 pyridoxina; 0,05 ácido nicotínico; 20 de sacarosa y 7 de Bacto-Agar. Los reguladores de crecimiento vegetal que se utilizaron fueron (mg dm^{-3}) 0,1 NAA/0,5 BAP y 0,1 NAA/1,0 BAP y el pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 con 1M NaOH previo a autoclavar por 20 min a 121 °C (110 000 Pa).

Anexo 2. Protocolo para la extracción de ADN

Pasos previos:

- a) Aislamiento de muestras
- b) Calentar el bloque a 65°C y colocar el buffer AE según la cantidad de muestras.
- c) Someter las muestras a Nitrógeno Líquido y triturar

Pasos de extracción:

1. Colocar 400ul de Buffer **API**, dar vórtex e Incubar por 10min a 65°C (mover los tubos cada 2 min)
2. Adicionar 130ul de **AP2** (lisis) y mezclar por pipeteo o vórtex.
3. Incubar por 5min en hielo.
4. Centrifugar por 5min a 14000rpm o 20000 Xg.
5. Verter el lisado (sobrenadante) a una **columna de color lila** con tubo.
6. Centrifugar por 2min a 14000rpm o 20000 Xg.
7. Transferir el sobrenadante del paso anterior a un nuevo tubo sin que se altere el pellet (eliminar el tubo con pellet), (se recupera aproximadamente 450ul si es menor se calcula su volumen para el siguiente paso)
8. Añadir 1.5 Vol. buffer **AP3/E** y mezclar por pipeteo (Ej.: 450ul equivale a 675ul), (puede ser 700ul)
9. Colocar 650ul del paso anterior en una **columna de color blanco** con tubo incluyendo cualquier precipitado y centrifugar por 1min a 8000rpm o 6000 Xg, (desechar el sobrenadante del tubo)
10. Repetir el paso anterior y al final desechar el sobrenadante más el tubo.
11. Colocar en un nuevo tubo la **columna blanca** añadiendo 500ul de Buffer **AW** y centrifugar por 1min a 8000rpm (desechar el sobrenadante del tubo)
12. Adicionar nuevamente 500ul de Buffer **AW**, pero centrifugar por 2min a 14000rpm (desechar el sobrenadante del tubo)

13. Transferir la **columna blanca** (con membrana) a un nuevo tubo y adicionar a la membrana 50ul de **AE** (calentado previamente al inicio del proceso), e incubar a 5min a temperatura ambiente.
14. Centrifugar por 1min a 8000rpm.
15. Añadir 50ul de **AE** (caliente).
16. Centrifugar por 1min a 8000rpm.
17. Descartar la **columna blanca** (con membrana) y reservar el líquido del tubo (DNA), que debe ser conservado a -20°C.