

Estandarización y optimización de técnicas moleculares para *Aloe barbadensis* Mill.

Standardization and optimization of molecular techniques for *Aloe barbadensis* Mill.

Nilca R. Albany de Vilchez^{1*}, Alba R. Nava Ferreira² y Jorge A. Vilchez Perozo³

¹Departamento de Química, ²Departamento de Agronomía, ³Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: nalbany@fa.luz.edu.ve / nilca.albany@gmail.com

Resumen

La aceptación de protocolos de micropropagación de aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) depende de la fidelidad genética de las plantas. Para estandarizar y optimizar las condiciones de la PCR como técnica molecular, se extrajo ADN de la zona media-basal del tejido foliar de vitroplantas e hijuelos parentales utilizando el protocolo de 2% CTAB/1,4M NaCl y ARNasa. Las condiciones de la PCR evaluadas fueron la cantidad de ADN (1 a 100 ng) por reacción, la concentración del MgCl₂ (1; 2; 3 y 4 mM) y la temperatura de hibridación (*T_a*) según la temperatura de *melting* (*T_m*) de 29 iniciadores RAPD e ISSR. Se logró la estandarización y optimización para 18 iniciadores, destacando que los RAPD OPA 02, OPA 13, OPC 01, OPC 19 y OPC 20 son reportados por primera vez en aloe. Se evidenciaron 18 iniciadores RAPD e ISSR que podrán ser utilizados como marcadores moleculares en estudios de fidelidad genética en plantas de aloe.

Palabras clave: aloe, PCR, RAPD, ISSR.

Abstract

The acceptance of micropropagation of aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) depends on the genetic fidelity of the plants. In order to standardize and optimize the conditions of polymerize chain reaction (PCR) as molecular technique, DNA was extracted from intermediate-base zone of leaf tissue of parental offshoots and vitroplants, using 2% CTAB/1,4M NaCl and ARNasa protocol. PCR conditions evaluated were amount of DNA per reaction (1 to 100 ng), concentration of

Recibido el 06-02-2017 • Aceptado el 15-08-2019

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: nalbany@fa.luz.edu.ve

MgCl₂ (1; 2; 3 and 4 mM), and annealing temperature (Ta) according to the melting temperature (Tm) of 29 primers RAPD and ISSR. Standardization and optimization of PCR conditions was obtained for 18 primers, noting that the RAPD OPA 02, OPA 13, OPC 01, OPC 19 and OPC 20 are the first report for aloe. There were 18 initiators RAPD e ISSR that can be used as molecular markers in genetic fidelity studies in aloe plants.

Keywords: aloe, PCR, RAPD, ISSR.

Introducción

La evaluación de la fidelidad genética de plantas micropropagadas de aloe puede ser valorada mediante marcadores morfológicos y moleculares, siendo necesaria en plantas que deseen ser comercializadas (Das *et al.*, 2015). Los estudios moleculares están basados principalmente en la amplificación del ADN a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*), que generan resultados confiables y reproducibles y no son influenciados por factores ambientales (Rathore *et al.*, 2011), que además pueden emplearse en etapas tempranas del cultivo *in vitro*. Entre ellos se destacan los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), los SSR (*Short Sequence Repeats*) y los ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Los RADP e ISSR han sido utilizados en estudios de diversidad, fidelidad y estabilidad genética en *A. barbadensis* (Das *et al.*, 2015; Rathore *et al.*, 2011; Samantaray y Maiti, 2008). En esta investigación se planteó estandarizar y optimizar las condiciones de la PCR para 26 RAPD y 3 ISSR en *A. barbadensis* que pudieran ser utilizados en estudios de fidelidad genética de plantas micropropagadas.

Materiales y métodos

La investigación fue realizada en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología “Profesora Silvia León de Sierralta” de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. El ADN se extrajo de la zona media-basal del tejido foliar de vitroplantas e hijuelos de *Aloe barbadensis* Mill., obtenidas por la propagación *in vitro* y convencional, respectivamente, utilizando el protocolo de 2% CTAB/1,4M NaCl y ARNasa (Nava *et al.*, 2015).

Para la optimización de las condiciones de la PCR se utilizó un volumen final de 25 µL de y 0,25 U de GoTaq® por reacción. Se evaluaron distintas cantidades de ADN que fueron desde 1 hasta 100 ng por reacción; así como distintas concentraciones de MgCl₂ (1; 2 y 3 mM), de dNTPs (0,1 y 0,2 mM), y de iniciadores RAPD (0,2; 0,4; 0,8 y 1 µM) de las series OPA, OPC, OPAE, OPN, OPQ, OPL y OPR (Panwar *et al.*, 2013; Rathore *et al.*, 2011; Nayanakantha *et al.*, 2010; Pardo *et al.*, 2008; Samantaray y Maiti, 2008; Toothman, 1999; Lanza *et al.*, 1997). Para los iniciadores ISSR C, ISSR E e ISSR F (Rathore *et al.*, 2011) se evaluaron las concentraciones 0,2; 0,4 y 0,8 µM.

Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf®, EP gradient S, con una desnaturalización inicial a 94 °C y una extensión final a 72 °C, la duración de cada fase dentro de los ciclos (desnaturalización a 94 °C, hibridación según el iniciador y extensión a 72 °C) y la temperatura de hibridación fueron estandarizadas. Para los RAPD se utilizaron de 40 a 45 ciclos y para los ISSR 35 ciclos. Los productos de las PCR fueron separados por electroforesis en geles de 1,5 % de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, visualizados en transiluminador de UV y fotografiados. Se determinó el número de bandas monomórficas y polimórficas en aquellos productos de la PCR que resultaron reproducibles en las tres repeticiones de las vitroplantas e hijuelo de *A. barbadensis*.

Resultados y discusión

Se optimizaron las condiciones de la PCR para 16 de los 26 RAPD probados y para 2 de los 3 ISSR evaluados, obteniéndose patrones reproducibles de bandeo en vitroplantas e hijuelo de *A. barbadensis* (cuadro 1). La mayoría de los iniciadores optimizados en esta investigación, amplificaron con cantidades de ADN inferiores a los valores señalados (2550 ng/reacción) para aloe por otros investigadores (Panwar *et al.*, 2013; Rathore *et al.*, 2011; Nayanakantha *et al.*, 2010; Samantaray y Maiti, 2008), siendo la cantidad de ADN por reacción, quizás el parámetro más crítico entre los componentes de la PCR para la optimización; ya que altas cantidades pudieran inhibir la Taq polimerasa

(Sambrook y Russell, 2001).

Nueve RAPD (OPC 01, OPC 02, OPC 05, OPC 17, OPC 19, OPC 20, OPA 02, OPA 09, OPA 13) y los ISSR (ISSR-E e ISSR-F) amplificaron cuando se utilizó la temperatura de *melting* (T_m) como temperatura de hibridación (T_a) en el termociclador a una concentración de 3 mM de MgCl₂, los siete RAPD restantes amplificaron el ADN de aloe a 2 o 4 °C por encima de su T_m y a una concentración de 2 mM de MgCl₂ (cuadro 1), favoreciéndose la especificidad del iniciador al aumentar la T_a (Sambrook y Russell, 2001).

La concentración de dNTPs fue ajustada para seis de los siete RAPD que amplificaron con una concentración de 2 mM de MgCl₂, dado que los dNTPs pueden capturar iones de magnesio afectándose la fidelidad de la PCR (McPherson y Geir, 2006).

Los ISSR y el 50% de los RAPD estandarizados mostraron un patrón de bandeo monomórfico entre hijuelos y vitroplantas siendo estos promisorios para estudios de fidelidad genética en aloe (cuadro 1). El número de bandas amplificadas en su mayoría estuvo por debajo de los señalados para esta especie en otras investigaciones (Panwar *et al.*, 2013; Rathore *et al.*, 2011; Nayanakantha *et al.*, 2010; Samantaray y Maiti, 2008).

Este es el primer señalamiento en aloe donde los RAPD OPA 02, OPA 13, OPC 01, OPC 19 y OPC 20 produjeron patrones de bandeo reproducibles. Estos iniciadores han sido utilizados en *Billbergia rosea* Hortus. ex Beer y *Zea mays* L. (Pardo *et al.*, 2008; Lanza *et al.*, 1999).

Cuadro 1. Estandarización de las condiciones de las PCR para los RAPD e ISSR y número de bandas obtenidas en *A. barbadensis*.

Iniciador	MgCl ₂ (mM)	dNTPs (mM)	Iniciador (μM)	ADN (ng/ reacción)	Tiempo y temperatura				Número de bandas					
					Di	Dc	Hc	Ec	Ef	Nº de ciclos	Vitroplan- ta:Hijuelo	M	P	Rango (pb)
OPC 01	3	0,2	1	5	5'	1'	50"/32°C	1'	7'	40	5:4	4	1	320 – 910
OPC 20	3	0,2	1	10	5'	1'	50"/32°C	1'	7'	40	10:11	9	3	299 – 1342
OPC 05	3	0,2	1	1	5'	1'	50"/34°C	1'	7'	40	5:7	3	6	228 – 949
OPA 09	3	0,2	1	2,5	5'	1'	50"/34°C	1'	7'	40	3:5	3	2	246 – 856
OPC 19	3	0,2	1	2,5	5'	1'	50"/34°C	1'	7'	40	7:7	7	0	242 – 1155
OPA 02	3	0,2	1	3	5'	1'	50"/34°C	1'	7'	40	4:3	1	5	209 – 949
OPA 13	3	0,2	1	5	5'	1'	50"/34°C	1'	7'	40	2:5	1	5	107 – 535
OPC 02	3	0,2	1	5	5'	1'	50"/34°C	1'	7'	40	4:4	4	0	169 – 580
OPC 17	3	0,2	1	7,5	5'	1'	50"/34°C	1'	7'	40	9:7	6	4	118 – 1263
OPA 07	2	0,2	1	10	5'	1'	50"/36°C	1'	7'	40	5:5	5	0	185 – 875
OPAE 01	2	0,1	0,2	20	3'	1'	1'/36°C	2'	4'	45	5:5	5	0	344 – 1122
OPAE 10	2	0,1	0,2	60	3'	1'	1'/36°C	2'	4'	45	5:5	5	0	689 – 1409
OPAE 11	2	0,1	0,2	20	3'	1'	1'/36°C	2'	4'	45	5:2	2	3	345 – 1878
OPAE 19	2	0,1	0,2	10	3'	1'	1'/36°C	2'	4'	45	8:8	8	0	324 – 1217
OPL 07	2	0,1	0,2	20	3'	1'	1'/36°C	2'	4'	45	8:8	8	0	335 – 1392
OPR 18	2	0,1	0,2	40	3'	1'	1'/36°C	2'	4'	45	9:9	9	0	458 – 1463
ISSR-E	3	0,2	0,4	5	5'	30"	30"/44°C	1'	4'	35	10:10	10	0	335 – 1132
ISSR-F	3	0,2	0,4	5	5'	30"	30"/44°C	1'	4'	35	8:8	8	0	502 – 1235

Di: Desnaturalización inicial a 94 °C. Dc: Desnaturalización en cada ciclo a 94 °C. Hc: Hibridación en cada ciclo. Extensión en cada ciclo a 72 °C. Ef: Extensión final a 72 °C. M: Monomórficas. P: Polimórficas.

Conclusiones

La estrategia basada en las modificaciones de las cantidades de ADN por reacción, la concentración del MgCl₂ y la temperatura de hibridación (Ta) como parámetros principales en la PCR para los RAPD e ISSR evaluados fue exitosa en el proceso de estandarización y optimización. La obtención de patrones de bandeo monomórficos en vitroplantas e hielos al utilizar algunos RAPD y los ISSR estandarizados son un indicio de que las plantas producidas por sistemas de propagación *in vitro* son fieles al material parental.

Aloe barbadensis Mill. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 32: 231-251.

Nayanakantha, N., B. Singth y A. Gupta. 2010. Assessment of genetic diversity in Aloe germoplasm accessions from India using RAPD and morphological markers. Ceylon J. Sci. Biol. Sci. 39: 1-9.

Panwar, B., R. Singh, V. Dwivedi, A. Kumar y P. Kumari. 2013. Genetic diversity among Indian Aloe accessions based on RAPD analysis. Int. J. Med. Aromat. Plants. 3: 326-333.

Pardo, A., C. Michelangeli, C. Ramis, N. Mogollón y C. Silva. 2008. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD, en brotes de *Billbergia rosea* Hortus. Ex Beer, conservado *sin vitro*. Bioagro 20: 97104.

Rathore, S., J. Chikara, C. Mastan, H. Rahman, K. Anand y N. Shekhawat. 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.

Samantaray, S. y S. Maiti. 2008. Rapid plant generation and assessment of genetic fidelity of *in vitro* raised plants in *Aloe barbadensis* Mill. using RAPD markers. Acta Bot. Gallica 155: 427-434.

Sambrook, J. y D. Russel. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2100 p.

Toothman, P. 1999. Method of identifying Aloe using PCR. United States Patent N° 6.001.572. Univera Pharmaceuticals, Inc., Broomfield, Colorado. Registro US006001572A.

Literatura citada

Das, A., S. Moquammel, B. Ghosh, K. Nandagopaly T. Baran. 2015. Morphological and Genetic Characterization of Micropropagated Field Grown Plants of *Aloe vera* L. Plant Tissue Cult. & Biotech. 25: 231-246.

Lanza, L., C. de Souza, L. Ottoboni, M. Vieira y A. de Souza. 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 94:10231030.

McPherson, M. y S. Geir. 2006. PCR. Segunda Edición. Taylor & Francis Group. New York. 292 p.

Nava, A., N. Albany y J. Vilchez. 2015. Protocolo de extracción de ADN para