



Evaluación de la fidelidad genética de plantas micropropagadas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) mediante marcadores RAPD

Luis Alfonso Muñoz-Miranda | Araceli Rodríguez-Sahagún
Gustavo Javier Acevedo-Hernández | Osvaldo Adrián Castellanos-Hernández
Centro Universitario de la Ciénega | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

correo-e: ocnosc@gmail.com

Resumen

Lippia graveolens HBK es una planta aromática de importancia económica en México, ha sido principalmente colectada de poblaciones silvestres. La propagación de manera natural es por lo general con semillas, que presentan un porcentaje de germinación bajo (40%). El cultivo de tejidos vegetales con yemas axilares propone una alternativa para la propagación de plantas. En el presente trabajo se reporta la evaluación de la fidelidad genética, mediante marcadores moleculares tipo RAPD de plantas de orégano obtenidas con la técnica de propagación de yemas axilares, que se realizó en medio MS con 0.5 mg/L de BA.

Palabras clave: *Lippia graveolens*, marcadores moleculares, fidelidad genética.

Introducción

Lippia graveolens (familia *Verbenaceae*), conocida como orégano mexicano, es una especie aromática nativa del sur de Estados Unidos de Norteamérica, México y parte de América Central (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2010).

México es uno de los países con mayor producción de orégano a nivel internacional, ya que aporta el 35 o 40% de la producción mundial. Se calcula que la producción anual en nuestro país es de 4 000 toneladas, de las cuales el 90% es exportado a los Estados Unidos (Villavicencio *et al.*, 2007).

El orégano mexicano es usado sobre todo como condimento y conservador en muchos alimentos típicos de México. El aceite esencial extraído a partir de las hojas se ha utilizado en la industria farmacéutica, licorera y cosmetológica. Además se le ha conferido varias propiedades medicinales, antimicrobianas y antioxidantes (Arcila-Lozano *et al.*, 2004; Ávila-Sosa *et al.*, 2010).

Su propagación, de forma natural, se realiza principalmente por semillas, aunque también se emplea el cultivo por estacas. El aprovechamiento se efectúa en poblaciones naturales durante el periodo de floración, alterando el desarrollo normal del fruto y de la semilla. Además de las malas prácticas de recolección, que generan una reducción del tamaño y la densidad de la población, se ha reportado que sólo el 44% de los frutos producen de una a dos semillas. Aunado a ello, la baja germinación de las semillas ha acarreado problemas para la propagación del cultivo (Ocampo-Velázquez, 2009; González-Nieves *et al.*, 2010).

Para tener una producción estable y continua de plantas de orégano que sirvan para originar plantaciones comerciales, es necesario contar con un sistema de propagación que no genere diferencias significativas en cuanto a la producción de aceite, por lo que los sistemas de propagación *in vitro* son una buena alternativa para usarse a nivel comercial.

En la búsqueda de alternativas de propagación se debe considerar la evaluación de la fidelidad gené-

tica entre las plantas madre y las propagadas, a fin de evidenciar la estabilidad genética entre ambos explantes. El empleo de marcadores moleculares es una herramienta para evidenciar la similitud o la variabilidad que produce el sistema de propagación, sin que se afecte el medio ambiente y la condición fisiológica o geográfica; asimismo, puede evaluarse en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Bece-rra y Paredes, 2000).

Las técnicas basadas en PCR, como los marcadores moleculares tipo RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) se han utilizado ampliamente por su simplicidad, bajo costo, estabilidad, sensibilidad, aunque presenta el inconveniente de baja reproducibilidad. Ese marcador ha sido aplicado con éxito en el análisis de la fidelidad genética en algunas plantas aromáticas micropropagadas: *Gloriosa superba* L. (Yadav *et al.*, 2013), *Pogostemon cablin* (Paul *et al.*, 2010), *Ocimum gratissimum* L. (Saha *et al.*, 2011), entre otras. En este estudio se evaluó la fidelidad genética mediante marcadores moleculares RAPD, de plantas obtenidas por la técnica de propagación *in vitro*.

Metodología

Material vegetal

Las semillas maduras de orégano mexicano (*L. graveolens*) fueron colectadas en el municipio de Colotlán, Jalisco, en el oeste de México, en la temporada de fructificación de marzo a mayo del 2010.

Proliferación de yemas axilares

Los segmentos nodales usados para la propagación fueron obtenidos de plantas germinadas *in vitro*, éstas fueron seleccionadas por sus características fenotípicas (mayor follaje y mayor número de segmentos nodales). Los segmentos nodales de tres plantas seleccionadas como donantes fueron establecidos en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), al cual se le adicionó Benciladenina (BA) como

regulador de crecimiento, a una concentración de 0.5 mg/L.

Condiciones RAPD

La extracción de ADN genómico de plantas adquiridas a partir del primer ciclo de propagación, se efectuó conforme al protocolo de Zhang & Hewitt (2004), con algunas modificaciones. La cuantificación del ADN se realizó mediante un NanoDrop® a una longitud de onda de 260 nm, la calidad del ADN fue verificada en geles de agarosa al 1%.

Se utilizaron iniciadores OPB 01-12 para evaluar la fidelidad genética del sistema de propagación. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 12.5 µl: 1 L de ADN (5 ng/µl), oligonucleótido 1 L (10mM), mezcla de dNTPs 1.5 L (0.4 mM), Taq polimerasa 0.15 L (5 U/ L), MgCl₂ 2 L (25 mM), buffer 10X 1.25 L y agua desionizada estéril 5.60 L.

La amplificación se hizo con el termociclador marca Techne modelo TC-412: una primera desnaturalización a 94 °C, 4 min; seguido de 45 ciclos a 94 °C, 1 min; 42 °C, 1 min; 72 °C, 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 88 V, en buffer TAE 1X. Los geles fueron teñidos en bromuro de etidio y visualizados bajo transiluminador UV.

Análisis de datos

Los polimorfismos detectados se escrutaron como presencia (1) o ausencia (0) de ADN amplificado. Con estos datos se prepararon matrices binarias que se usaron para calcular valores de similitud genética entre cada individuo con el coeficiente de Jaccard, incluido en el paquete estadístico FreeTree. Los dendrogramas fueron preparados aplicando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages) (Rohlf, 1997), con el programa TreeView versión 1.6.6.

Resultados y discusión

El patrón de bandeo de las plantas micropropagadas seleccionadas al azar fueron comparadas con la planta madre (obtenida de semilla). Los iniciadores generaron distintos perfiles de amplificación (figura 1).

El dendrograma construido a partir de las distancias genéticas (figura 2) muestra que la planta madre, así como sus hijas (obtenidas por proliferación de yemas axilares) se encuentra en un mismo grupo. Por ello es posible determinar que los cambios generados con el método de propagación son mínimos, determinados a partir del marcador RAPD. Saha *et al.* (2012) reportan fidelidad genética en la planta aromática *Ocimum gratissimum* L. mediante micropropagación por yemas axilares. Aunque se pueden observar variaciones genéticas mediante este sistema de propagación (Gupta *et al.*, 2009).

La baja variabilidad del sistema de propagación es importante en las metodologías de mejoramiento genético, ya que asegura la producción del genotipo mejorado sin cambios evidentes por efectos del sistema de propagación.

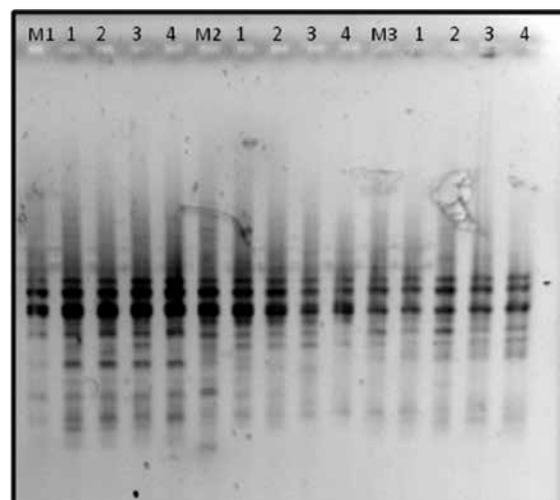


Figura 1. Patrón electroforético de los marcadores rapd (iniciador opb-08) adquiridos de las plantas madre (M1, M2 y M3) y las plantas obtenidas de los segmentos nodales (1-4).

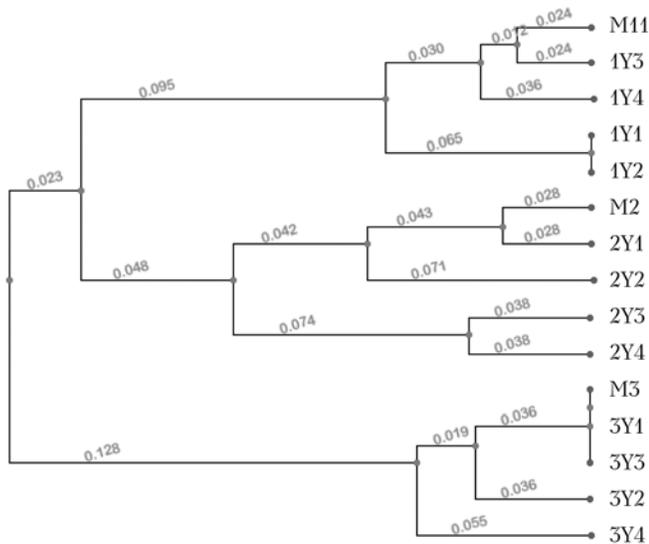


Figura 2. Dendrograma obtenido a partir de marcador RAPD de las plantas micropropagadas por yemas axilares y su respectiva planta madre.

Conclusiones

Mediante el uso de los marcadores moleculares tipo RAPD fue posible evidenciar la alta tasa de fidelidad genética que proporciona el sistema de propagación por medio de yemas axilares. Se propone esta metodología en los sistemas de producción de plantas de orégano con fines comerciales, con ello se garantizaría la homogeneidad de los cultivos para lograr mayores rendimientos y así evitar la excesiva depredación de la especie en su hábitat natural.

Agradecimientos

Al equipo de trabajo del LBMV del Centro Universitario de la Ciénega.

Referencias

- Arcila-Lozano, C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., González-Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1):100-104.
- Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M.G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J.V., Nevárez-Moorillón, G.V. (2010). Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3):434-440.
- Becerra, V., Paredes C., M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60(3):270-284.
- González-Nieves, C., Arreola-Ávila, J.G., García-Herrera, G., Rodríguez-Lopez, J.S., Carrillo-Flores, R., Esquivel Arriaga, O., Villa-Castorena, M. (2010). Efectos de tratamientos pregerminativos en la emergencia y crecimiento de plántulas de orégano (*Lippia graveolens* HBK). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 9(2):129-134.
- Gupta, R., Modgil, M., Chakrabarti, S.K. (2009). Assessment of genetic fidelity of micropropagated apple rootstock plants, EMLA 114, using RAPD markers. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(11):925-928.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Ocampo-Velázquez, R.V., Malda-Barrera, G.X., Suárez-Ramos, G. (2009). Biología reproductiva del orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) en tres condiciones de aprovechamiento. *Agrociencia*, 43(5):475-482.
- Paul, A., Thapa, G., Basu, A., Mazumdar, P., Kalita, M.C., Sahoo, L. (2010). Rapid plant regeneration analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. An industrially important aromatic plant. *Industrial Crops and Products*, 32(3):366-374.
- Rohlf, F.J. (1997). NTSYS- μ Numerical taxonomy and multivariate analysis system (Version 2.00). Setauket, New York: Exeter Software Publications.
- Saha, S., Kader, A., Segupta, C., Ghosh, P. (2012). *In vitro* propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and its evaluation of genetic fidelity using RAPD marker. *American Journal of Plant Sciences*, 3(1):64-74.
- Villavicencio, G.E.E. (2007). Orégano, recurso con alto potencial. *Ciencia y Desarrollo*, 33(214):60-66.
- Villavicencio-Gutiérrez, E., Cano-Pineda A., García-Cuevas, X. (2010). *Metodología para determinar las existencias de orégano (Lippia graveolens h.b.k.) en Rodales Naturales de Parras de la Fuente Coahuila*. Saltillo:

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias.

Yadav K., Aggarwal, A., Singh, N. (2013). Evaluation of genetic fidelity among micropropagated plants of *Gloriosa superba* L. using DNA-based markers: a potential medicinal plant. *Fitoterapia*, 89:265-270.

Zhang, D.X., Hewitt, G.M. (2004). Special DNA extraction methods for some animal species (pp. 27-34). En: Karp, A., Isaac, P., Ingram, D. (Eds.), *Molecular tools for screening biodiversity*. London: Chapman & Hall.