

27. Agroalimentos

Evaluación de la relación genética entre líneas avanzadas de *Stevia rebaudiana* basada en el análisis de marcadores SSR e ISSR

Bogado Villalba, Liz; Flores Giubi, María Eugenia; Iehisa, Julio C.M.; Nakayama, Héctor.

lizbog09@gmail.com

Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas

Universidad Nacional de Asunción

Resumen

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, es una especie herbácea, de gran valor económico a nivel mundial, principalmente debido a su empleo como edulcorante natural, el cual se caracteriza por su gran potencia y falta de aporte calórico. Pese a que el Paraguay constituye el centro de origen de la *S. rebaudiana*, no se ha abordado la cuestión referente a la variabilidad genética en cultivos nacionales, lo cual constituye un paso clave para desarrollar de manera eficiente estrategias de mejora genética de este cultivo. De modo a ampliar el conocimiento sobre la variabilidad de la *S. rebaudiana*, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las relaciones genéticas existentes entre distintas líneas avanzadas de *S. rebaudiana* desarrolladas por el Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA). Para la caracterización molecular de los 12 genotipos de *S. rebaudiana* se emplearon 23 marcadores SSR e ISSR y fue construido el dendrograma empleando el método UPGMA utilizando los *loci* obtenidos con ambos tipos de marcadores. Se reveló una variabilidad sustancial entre los 12 genotipos de *S. rebaudiana* usando marcadores moleculares SSR e ISSR, además se demostró la eficacia de estos marcadores para la identificación de tres genotipos de *S. rebaudiana* al actuar como marcador específico.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana*, marcadores moleculares, variabilidad genética, SSR, ISSR.

Introducción

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni conocida como *Ka'a he'ë* en guaraní, es una especie herbácea originaria de Paraguay, cuya comercialización y consumo, tanto de hojas secas como del extracto, se han extendido mundialmente debido a que sus principios edulcorantes carecen de toxicidad y a su falta de aporte calórico, impartiendo gran valor económico y comercial a este cultivo (Aranda-González et al. 2014, Shirwaikar et al. 2011).

Los esteviol glicósidos constituyen metabolitos secundarios y son los responsables del carácter dulce de la *S. rebaudiana*, los mismos poseen elevado poder edulcorante; siendo el esteviósido y el rebaudiósido A los que se hallan en mayor concentración y son entre 300 a 450 veces más dulce que la sacarosa respectivamente (Lorenzo et al. 2014). La variabilidad de la concentración de los esteviol glicósidos es dependiente de diversos factores entre los cuales se destaca el genotipo (Jiménez et al. 2010). La diversidad genética surge como consecuencia del polimorfismo genético, los cuales son debidos a variaciones en la secuencia del ADN por deleciones, inserciones o sustituciones de sus nucleótidos (Chester et al. 2013; Robiansyah et al. 2015). Una herramienta útil para la detección de la variabilidad

genética o polimorfismo genético son los marcadores moleculares, los cuales pueden distinguirse de acuerdo a su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples (Eguiarte et al. 2007; Ferreira & Grattapaglia 1998). La eficiencia de los marcadores moleculares depende del grado de polimorfismo generado por los *primers*, es decir, el número de bandas polimórficas originadas (Parveen et al. 2013).

En varias regiones del mundo que poseen áreas cultivadas de *S. rebaudiana*, se han reportado el empleo de los marcadores moleculares AFLP (Heikal et al. 2008), RAPD (Chester et al. 2013), SSR o microsatélites (Bhandawat et al. 2014; Hastoy et al. 2015) y los ISSR en el análisis genético de *S. rebaudiana* (Khan et al. 2013; Subositi et al. 2011). Sin embargo, pese a que nuestro país constituye el centro de origen de *S. rebaudiana*, no se ha abordado la cuestión referente a la variabilidad genética en cultivos nacionales.

Las secuencias simples repetidas (SSR) o microsatélites y los inter-SSR (ISSR) son marcadores moleculares ampliamente utilizados para la evaluación de la variación genética intra específica de cultivares debido al elevado número de bandas polimórficas generadas, así como su reproducibilidad comparado con otros marcadores, además, constituyen

marcadores neutrales a las interacciones entre la expresión genética y el ambiente (Eguiarte et al. 2007; Heikal et al. 2008; Subositi et al. 2011).

El Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) se encuentra actualmente trabajando en el desarrollo de líneas avanzadas de *S. rebaudiana*, por ende, la evaluación de la relación genética entre los distintos genotipos de *S. rebaudiana* procedentes de la variedad Criolla mediante el empleo de los marcadores moleculares, podría contribuir significativamente al conocimiento de la diversidad genética de este cultivo, así como en la producción y desarrollo de materiales mejorados que permitan la selección y cruzamiento de aquellos genotipos superiores, integrando técnicas clásicas del mejoramiento genético vegetal con las modernas de biotecnología.

Objetivos

El objetivo general de esta investigación fue evaluar las relaciones genéticas existentes entre distintas líneas avanzadas de *S. rebaudiana* empleando marcadores moleculares SSR e ISSR.

Materiales y Métodos

Material vegetal: se utilizaron hojas frescas de 12 genotipos de *S. rebaudiana* procedentes del IPTA compuestos por las variedades *Eirete* y *Katupyry*, además de

10 líneas avanzadas: VC IAN A, VC IAN B, VC IAN C, VC 1, VC 2, VC 3a, VC 4, VC 5a, VC 6 y VC 7 electas en base a características agronómicas superiores teniendo en cuenta los criterios de mayor vigor en porte, menor distancia de entrenudos y mayor masa foliar.

Extracción y cuantificación de ADN: se efectuó siguiendo el método bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Doyle & Doyle (1990). La calidad del ADN se verificó realizando electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con el agente intercalante *Diamond™ Nucleic Acid Dye* (Promega, USA) y revelados con luz ultravioleta (Heikal et al. 2008; Subositi et al. 2011). La concentración y pureza del ADN se determinaron empleando el espectrofotómetro DS-11 FX (Denovix, USA).

Amplificación del ADN: se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el termociclador T100 (Bio-Rad, USA) empleando la polimerasa *GoTaq®* (Promega), 10 marcadores ISSR y 13 marcadores SSR específicos para *S. rebaudiana* (Tabla 1). Las condiciones de amplificación usadas fueron siguiendo el protocolo establecido por Heikal et al. (2008); Subositi et al. (2011) y Bhandawat et al. (2014). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con *Diamond™ Nucleic Acid Dye* y revelados con luz

ultravioleta, la imagen del gel fue digitalizada mediante el fotodocumentador Gel Doc EZ Imaging System (Bio-Rad, USA).

Tabla 1. Secuencia de marcadores ISSR y SSR usados en la amplificación del ADN de *S. rebaudiana*

Marcador	Secuencia
ISSR 1	(CT) ₈ GC
ISSR 2	(CA) ₆ AC
ISSR 3	(CA) ₆ GT
ISSR 4	(GA) ₆ CC
ISSR 5	(CAC) ₃ GC
ISSR 6	(GTG) ₃ GC
ISSR 7	(AG) ₈ Y
ISSR 8	(AC) ₈ G
ISSR 9	(GA) ₈ T
ISSR 10	(AG) ₈ YC
SUGMS 2	F: CACAATGGCAGCAATAACCA R: GCCATCATCGTCACTCCTCT
SUGMS 11	F: TCCCAAGGCTAGAACTCGTG R: GCACTCGCCCTGTTTGTATT
SUGMS 23	F: CGCGATTGCTTTGAAATATG R: CTTCTCCTACGGGATCGAC
SUGMS 26	F: TGGTTTTTGACAACGTGGAG R: CCTCCACTTTTCGCCTTTTT
SUGMS 38	F: CGTTCGTCCTCCATCAAT R: GCCCATCCGTTATCTTTCT
SUGMS 50	F: ACCAAAGATCGCCACCAC R: CAAGGCTGAATCGGAAGAAG
SUGMS 5	F: TCTCTGCACCATGACTGCTC R: GATCTCCCACTTGCATCTCC
SUGMS 52	F: TCCCAATTCAAATCCCTCAA R: CGTTTGTGGTGCAGATTACG
SUGMS 30	F: TTCAATCTTAGCCGGCATC R: GGACGAATCAAACCAACCA
SUGMS 13	F: GTAGTAGCAGTGGCGGTGGT R: CCGGGTTATCCTGGTTAGGT
SUGMS 35	F: GGAATCGGTGCAGCTATGTT R: TGGAAGATTTACAATTACA
SUGMS 37	F: TCATCAAAGTGAACCATCA R: CCAAGGGTCTTTTCATCTTT
SUGMS 18	F: GGAAAGAATGCCGAATTTGA R: TGAGGATGAAGACGATGCTG

Análisis estadístico: para evaluar las relaciones genéticas entre los genotipos, se realizó una conversión de los datos procedentes de las bandas obtenidas en los geles a binarios, es decir, fueron registrados como 0 y 1 para ausencia y

presencia, respectivamente de los alelos. Para estimar el poder de discriminación de los marcadores SSR e ISSR, se calculó el contenido de información de polimorfismo (PIC) conforme a lo descrito por Botstein et al. (1980) y fue promediado el valor de PIC de todas las bandas de cada marcador para obtener su valor promedio. Este parámetro evalúa la probabilidad de que un marcador encuentre diferencias entre dos individuos en al menos un locus y su valor varía desde 0 (monomórfico o no discriminatorio) hasta 1 (muy polimórfico o altamente discriminatorio, con varios alelos en igual frecuencia), teniendo en cuenta la frecuencia de cada uno de los alelos presentes en la población (Powell et al. 1996).

Además, se construyó un dendrograma con el software Past versión 3.14 para el análisis de distribución de los grupos generados (*clusters*) en base a las similitudes genéticas, mediante el coeficiente de Jaccard utilizando el método UPGMA (método de agrupamiento no ponderado con medias aritméticas).

Resultados y Discusión

Polimorfismo de los marcadores SSRs e ISSRs. De un total de 23 marcadores utilizados para el estudio de 12 genotipos de *S. rebaudiana*, los que no presentaron polimorfismos fueron SUGMS 2, SUGMS 5 y SUGMS 52, todos correspondientes al

marcador SSR. Estos marcadores fueron descartados para los estudios posteriores. A partir de los productos de amplificación de los genotipos analizados con los 20 marcadores que resultaron polimórficos, se identificaron 29 *loci*, de los cuales 10 corresponden a SSR y 19 a ISSR. La diferencia en la cantidad de locus entre ambos tipos de marcadores es debida a que los marcadores SSR están diseñados para amplificar un *locus* específico mientras los ISSR son capaces de amplificar múltiples *loci*. El tamaño de dichos productos de amplificación osciló en un rango de 150 a 1300 pb.

La reproducibilidad de los productos amplificados y la intensidad de las bandas fueron los criterios considerados en la selección de los marcadores. Se hallaron tres marcadores específicos (ISSR 2,

ISSR 3 e ISSR 7) para ciertos genotipos debido a la presencia de bandas únicas para los genotipos VC 7, *Katupyry* y VC 5a respectivamente. La mayor cantidad de bandas específicas fue generada por el marcador ISSR 3 con dos bandas de 230 y 290 pb (Figura 1), mientras que los marcadores ISSR 2 e ISSR 7 produjeron una banda específica cada uno de 500 pb para el genotipo VC 7 y 530 pb para el genotipo CV 5a respectivamente. Esto concuerda con los resultados de Heikal et al. (2008) y Subositi et al. (2011), quienes lograron identificar individualmente cada genotipo de *S. rebaudiana* con marcadores SSR e ISSR, difiriendo en la cantidad media de perfiles generados por marcador por genotipo de *S. rebaudiana*. Los resultados demostraron la utilidad de los marcadores SSR e ISSR para la

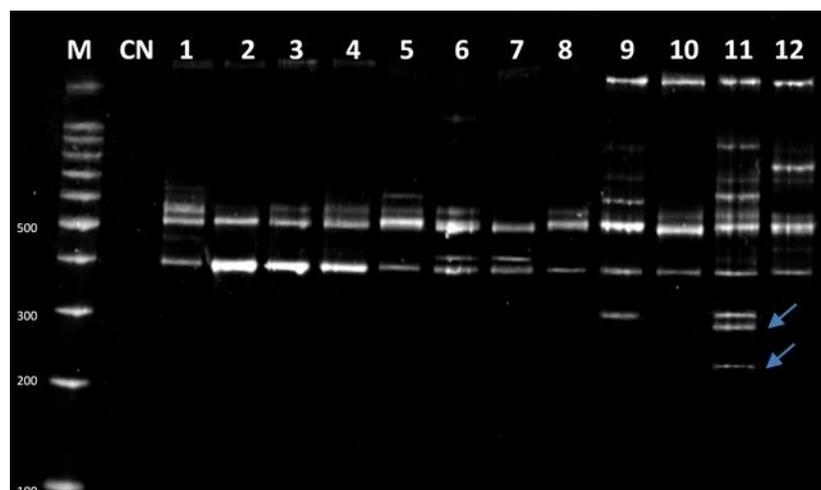


Figura 1. Productos de amplificación de genotipos de *S. rebaudiana* (carriles 1 al 12) empleando el marcador ISSR 3 en gel de poliacrilamida. **M** corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb. Las flechas indican las bandas específicas de 290 y 230 pb para el genotipo *Katupyry*. **CN** es el control negativo que contiene agua en lugar de ADN. **Referencias de carriles:** 1. VC 7, 2. VC 6, 3. VC 5a, 4. VC 4, 5. VC IAN C, 6. VC 3a, 7. VC 2, 8. VC IAN B, 9. *Eirete*, 10. VC 1, 11. *Katupyry*, 12. VC IAN A.

identificación de distintos genotipos de *S. rebaudiana* debido a las bandas polimórficas obtenidas con ambos tipos de marcadores y su potencial para establecer la identidad genética de genotipos a ser empleados en programas de mejora de la producción de *S. rebaudiana* con alto contenido de esteviol glicósidos.

Estimación de contenido de información de polimorfismo (PIC). Se evaluó el PIC para determinar el grado de polimorfismo de un *locus* o un marcador teniendo en cuenta el número de alelos y la frecuencia de cada alelo. Los valores hallados para los marcadores ISSR fluctuaron entre 0,141 (ISSR 2) y 0,373 (ISSR 1) (Tabla 2), lo cual concuerda con lo observado por Petolescu et al. (2011). Teniendo en cuenta que el valor máximo de PIC para los marcadores que presentan dos alelos es de 0,375; los marcadores ISSR no superarán este valor de PIC dada la naturaleza dominante de estos marcadores, lo cual hace presumir que fragmentos de igual longitud amplificados representan un *locus* único con dos posibles alelos: presencia (alelo 1) y ausencia de la banda (alelo 2).

Los marcadores SSR son descritos como aquellos con mayor PIC dentro de los genomas de los eucariontes debido a que el número de alelos puede ser mucho mayor y son codominantes (Powell et al. 1996; Yasuda 1988). Sin embargo, los marcadores SSR analizados presentaron

valores PIC de 0,239 a 0,368 (Tabla 2). Esto se debe a que todos ellos exhibieron dos alelos cuya frecuencia en la mayoría de los casos fue alrededor de 0,5; siendo 0,375 el valor máximo de PIC para marcadores que presentan dos alelos (Cooper, 1994; Yasuda, 1988), lo cual indica un nivel de polimorfismo relativamente alto. Debido al alto grado de polimorfismo de estos marcadores, su uso es altamente recomendado para el estudio de la diversidad genética de *S. rebaudiana* y futuros estudios del cribado de las variedades mejoradas de este cultivo.

Tabla 2. Datos de PIC promedio obtenidos con los marcadores SSR e ISSR en *S. rebaudiana*.

Marcadores SSR e ISSR	Rango bandas consideradas (pb)	PIC promedio
SUGMS 11	205	0,239
SUGMS 13	185	0,239
SUGMS 18	170	0,239
SUGMS 23	253	0,368
SUGMS 26	248	0,239
SUGMS 30	280	0,305
SUGMS 35	600	0,346
SUGMS 37	225	0,305
SUGMS 38	205	0,305
SUGMS 50	150	0,286
ISSR 1	600	0,373
ISSR 2	500 – 530	0,141
ISSR 3	230 – 300	0,202
ISSR 4	680	0,346
ISSR 5	250 – 1300	0,247
ISSR 6	500	0,346
ISSR 7	1000 – 485	0,297
ISSR 8	700	0,356
ISSR 9	700	0,346
ISSR 10	700 – 750	0,304

Similitud genética y análisis de *clústers* basados en los marcadores SSR e ISSR.

Utilizando los 29 *loci* obtenidos con los marcadores SSR e ISSR fue construido el

dendrograma empleando el método UPGMA basado en el coeficiente de Jaccard, con lo cual se logró agrupar a los genotipos estudiados en dos *clústers* principales y éstos divididos a su vez en dos subgrupos o subclústers (Figura 2). Los dos *clústers* principales (*Clúster I* y *Clúster II*) se hallan conformados cada uno por seis genotipos de *S. rebaudiana*. Genotipos como VC IAN A, VC IAN B, VC IAN C, VC 3a, *Katupyry* y *Eirete* fueron genéticamente similares entre sí. Mientras que los genotipos VC 1, VC 2, VC 4, VC 5a, VC 6 y VC 7 presentaron perfiles

mismos (0,889). Cabe resaltar que las variedades mencionadas corresponden a los genotipos mejorados con el mayor contenido de rebaudiósido A que han sido registrados por el IPTA.

Dada la relevancia de la *S. rebaudiana* como edulcorante, estos marcadores podrían ser de gran utilidad en la identificación de genes candidatos implicados en el alto contenido de esteviol glicósidos. Los marcadores moleculares estrechamente ligados a este gen causante pueden ser implementados como marcadores de selección.

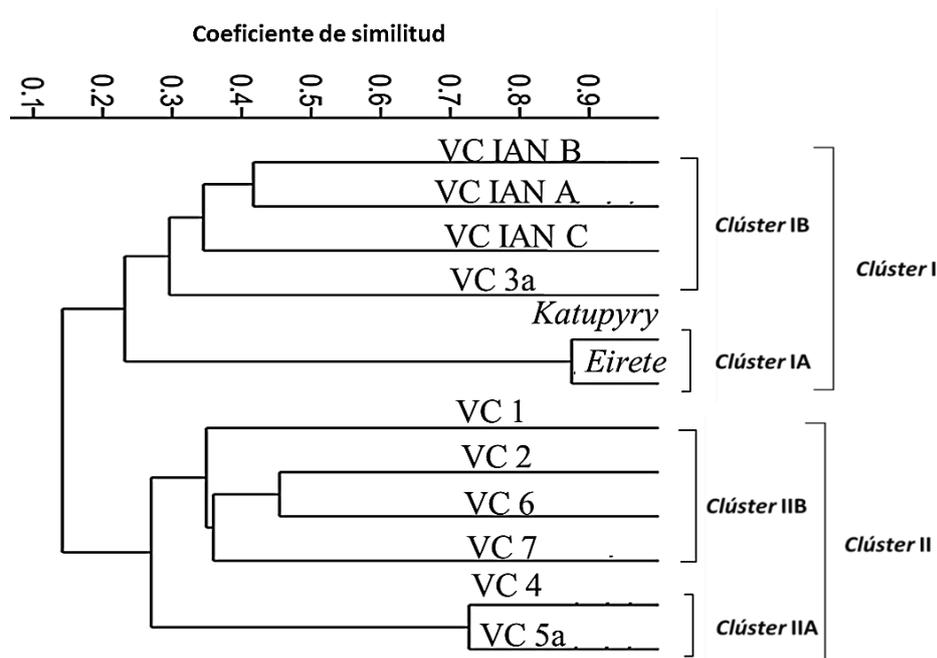


Figura 2. Dendrograma construido por el método de UPGMA para la visualización de la relación genética entre los 12 genotipos de *S. rebaudiana* analizados.

genéticos similares. Dentro del Clúster I se observó un subgrupo conformado por las variedades *Eirete* y *Katupyry*, ambas estrechamente relacionadas con un elevado índice de similitud entre los

Conclusiones

Los marcadores SSR e ISSR empleados han demostrado ser efectivos para la identificación de genotipos al actuar como

marcador específico en algunos casos y en la evaluación de la diversidad genética entre los distintos genotipos de *S. rebaudiana* debido al elevado nivel de polimorfismo obtenidos con ambos tipos de marcadores. El elevado nivel de variabilidad genotípica hallada entre los diferentes genotipos evaluados podría ser de utilidad para el desarrollo de estrategias eficientes en el proceso de mejoramiento de *S. rebaudiana*.

Bibliografía

- Aranda-González, I; Moguel-Ordoñez, Y; Betancur-Ancona, D. 2014. Rapid HPLC Method for Determination of Rebaudioside D in Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in the Southeast of México. American Journal of Analytical Chemistry. 5, 813-819.
- Bhandawat, A; Sharma, H; Nag, A; Singh, S. 2014. Functionally relevant novel microsatellite markers for efficient genotyping in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Genetics 93: 75-81.
- Botstein, D, White, RL, Skolnick, M, Davis, RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics 32: 314-331.
- Chester, K; Tamboli, ET; Parveen, R; Ahmad, S. 2013. Genetic and metabolic diversity in *Stevia rebaudiana* using RAPD and HPTLC analysis. Pharmaceutical biology 51(6): 771-7.
- Cooper, NG. 1994. The human genome project: deciphering the blueprint of heredity. Mill Valley, USA: University Science Books. 360 p.
- Doyle, JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12:13-15.
- Eguiarte, L; Souza, V; Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. 1º ed. México: Progreso. 608 p.
- Ferreira, ME; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasil: Embrapa. 221 p.
- Hastoy, C; Cosson, P; Sclaunich, E; Jannot, P; Boutié, P; Rolin, D; Schurdi-Levraud, V. 2015. Towards Breeding of new *Stevia rebaudiana* cultivars adapted to organic production in the south west of France. First Results on Genetic and

- Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina
- 17, 18 y 19 de octubre de 2018
- Phenotypic Evaluation. In: Proceedings of the 8th *Stevia* Symposium EUSTAS (8, 2015, University of Bonn). Bonn, GR. p. 225-232.
- Heikal, A. H; Badawy, OM; Hafez, AM. 2008. Genetic relationships among some *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) accessions based on ISSR analysis. Research Journal of Cell and Molecular Biology 2(1): 1–5.
- Jiménez, T; Cabrera, G; Álvarez, E; Gómez, F. 2010. Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente . Estudio preliminar. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud 8(1): 47-53.
- Khan, SA; Rahman, LU. 2013. Agrobacterium tumefaciens - mediated transgenic plant and somaclone production through direct and indirect regeneration from leaves in *Stevia rebaudiana* with their glycoside profile. Protoplasma 251 (3): 661-70.
- Lorenzo, C; Serrano-Díaz, J; Plaza, M; Quintanilla, C; Alonso, GL. 2014. Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. Food Chemistry 157: 518-523.
- Parveen, S; Saharan, MS; Verma, A; Sharma, I. 2013. Comparative analysis of RAPD and ISSR marker assays for detecting genetic polymorphism in *Tilletia indica*. Europ. J. Exp. Biol. 3: 380 – 387.
- Petolescu, C; Lazar, A; Petrescu, I; Ioja-Boldura, OM; Velicevici, G; Banu, C. 2011. Somaclonal variation at the nucleotide sequence level revealed by RAPD and ISSR markers. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology 15 (4), 119-123.
- Powell, W; Morgante, M; Andre, C; Hanafey, J; Vogel, S; Tingey, A; Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis Mol Breeding 2: 225.
- Robiansyah, I; Ramadan, A; Al-Kordy, MA; Ghushash, AS; Hajar, AS. 2015. Characterization of a New Biotype Moringa of Saudi

- Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina
- Arabia Using Rapd and Issr Markers. Buletin Kebun Raya 18 (2), 99-110.
- Shirwaikar, A; Parmar, V; Bhagat, J; Khan, S. 2011. Identification and estimation of stevioside in the commercial samples of *Stevia* leaf and powder by HPTLC and HPLC. International Journal of Pharmacy & Life Sciences 2(9): 1050-1058.
- Subositi, D; Sri K., R; Daryono, BS. 2011. Genetic diversity of *stevia* (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) based on molecular characters. Proceeding 1(1): 37 - 41.
- 17, 18 y 19 de octubre de 2018
- Yasuda, N. 1988. HLA Polymorphism Information Content (PIC). Jpn. J. Human Genet. 33, 385-387.

Agradecimientos

Al IPTA por proveer los genotipos de *S. rebaudiana*, a la Facultad de Ciencias Químicas por conceder el acceso al laboratorio de Fitoquímica y empleo de materiales y equipos de dicha institución.

Financiamiento

Instituto de Biotecnología Agrícola (INBIO), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).